

Université de Sherbrooke

Identification d'une nouvelle forme du facteur de transcription PLZF  
et implication dans le maintien de l'épithélium intestinal

Par Christine Jones  
Département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé  
En vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.) en biologie cellulaire

Mémoire évalué par :

Dr François Boudreau, département d'anatomie et de biologie cellulaire  
Dr Jean-François Beaulieu, département d'anatomie et de biologie cellulaire  
Dre Claire Dubois, département de pédiatrie

Avril 2007



Library and  
Archives Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Published Heritage  
Branch

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file    Votre référence*

*ISBN: 978-0-494-31406-7*

*Our file    Notre référence*

*ISBN: 978-0-494-31406-7*

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

  
**Canada**

# TABLE DES MATIÈRES

<b>LISTE DES ILLUSTRATIONS .....</b>	<b>V</b>
<b>LISTE DES ABBRÉVIATIONS .....</b>	<b>VII</b>
<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>IX</b>

<b>I- INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
1. Anatomie du tube digestif.....	1
2. L'épithélium intestinal .....	2
2.1 Épithélium de l'intestin grêle .....	2
2.1.1 Organisation et dynamique de l'axe crypte-villosité .....	2
2.1.2 Les cellules souches .....	5
2.2 Le côlon .....	7
2.2.1 Organisation et dynamique de la crypte colonique .....	7
2.2.2 Le cancer colorectal .....	8
2.3 Les modèles cellulaires épithéliaux de l'intestin .....	10
2.3.1 Modèle pour l'étude de la différenciation épithéliale intestinale du grêle .....	10
2.3.2 Modèle pour l'étude de la prolifération épithéliale normale de l'intestin grêle .....	11
2.3.3 Modèles de cellules cancéreuses colorectales humaines.....	12
3. Le facteur de transcription PLZF .....	12
3.1 Généralités .....	12
3.2 Les domaines de PLZF .....	14
3.2.1 Le domaine BTB/POZ .....	15

3.2.2 Le domaine RD2 .....	15
3.2.3 Les 9 doigts de zinc .....	17
3.3 La répression transcriptionnelle par PLZF .....	19
3.4 Fonctions du répresseur transcriptionnel PLZF .....	21
3.4.1 Implication de PLZF dans la régulation du cycle cellulaire des cellules myéloïdes.....	22
3.4.2 PLZF et le cancer .....	23
3.4.3 Implication de PLZF dans le développement .....	25
3.4.4 Implication du répresseur PLZF dans le maintien des cellules souches .....	28
3.4.4.1 PLZF et l'hématopoïèse.....	28
3.4.4.2 PLZF et la spermatogénèse.....	31
4. Problématique et objectif du projet de recherche .....	32
<b>II- MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>33</b>
1. Culture cellulaire.....	33
1.1 Les cellules 293T .....	33
1.2 Les cellules HIEC .....	33
1.3 Les cellules Caco-2/15 .....	34
1.4 Les cellules T84.....	34
1.5 Les cellules DLD-1 .....	35
1.6 Les cellules Colo205 .....	35
1.7 Les cellules HCT-116 .....	36
2. Extractions protéiques .....	36
2.1 Extraction des protéines totales .....	36



2.1.1 Extraction à partir de cellules en culture .....	36
2.1.2 Extraction à partir de tissu fœtal humain .....	37
2.2 Extraction des protéines suite au fractionnement des compartiments cellulaires .....	38
2.2.1 Extraction à partir de cellules .....	38
2.2.2 Extraction à partir de cellules épithéliales isolées chez la souris selon la technique de Weiser .....	39
3. Extraction de l'ARN total .....	41
3.1 Extraction à partir de cellules en culture .....	41
3.2 Extraction à partir de tissu fœtal humain (côlon et estomac) .....	42
4. Réaction de transcription inverse et polymérisation en chaîne (RT-PCR) .....	43
5. Traitement de cellules avec différents inhibiteurs de protéases .....	45
6. Préparation des différentes constructions plasmidiques .....	46
6.1 Clonage de PLZF dans le vecteur pBabe puro .....	46
6.2 Clonage de PLZF $\Delta$ 1 <sup>er</sup> ATG dans pBabe puro .....	47
6.3 Clonage de PLZF1 <sup>er</sup> ATG $\rightarrow$ ATA dans TOPO .....	48
7. Transfection transitoire d'ADN dans les cellules en culture .....	49
8. Immunoprécipitations .....	50
9. Immunobuvardage de type Western .....	51
9.1 La migration et le transfert .....	51
9.2 La détection des antigènes .....	52
10. Essai de transcription/traduction in vitro avec des réticulocytes de lapin .....	53
11. Localisation de PLZF et la cytokératine 18 par immunofluorescence .....	54

<b>III- RÉSULTATS</b> .....	56
1. Expression protéique de PLZF dans les cellules épithéliales intestinales humaines ..	
.....	56
2. Origine de PLZF 65 kDa .....	58
3. Localisation de PLZF 65 kDa dans la cellule .....	66
4. Profil d'expression de PLZF 65 kDa au cours de la prolifération et de la	
différenciation cellulaire.....	68
5. Expression et localisation de PLZF <i>in vivo</i> .....	71
 <b>IV- DISCUSSION</b> .....	 74
1. Une forme écourtée de la protéine PLZF est identifiée dans les cellules cancéreuses	
colorectales humaines et dans les cellules normales de la crypte d'iléon humain .....	74
2. Détermination de l'origine de PLZF 65 kDa .....	75
3. PLZF 65 kDa est localisé dans le cytosquelette des cellules cancéreuses colorectales	
humaines et des cellules épithéliales coloniques de souris .....	81
4. Implication de PLZF 65 kDa dans la prolifération et/ou le maintien de l'état	
indifférencié des cellules épithéliales intestinales .....	82
5. Analyse du rôle potentiel de PLZF 65 kDa dans le cytosquelette des cellules	
épithéliales intestinales.....	84
 <b>V- CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b> .....	 87
 <b>REMERCIEMENTS</b> .....	 90
 <b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	 92

# LISTE DES ILLUSTRATIONS

## I- Liste des figures

Figure 1. Dynamique de l'épithélium intestinal .....	4
Figure 2. Hiérarchie de la population souche épithéliale intestinale .....	6
Figure 3. Représentation schématique du répresseur transcriptionnel PLZF .....	13
Figure 4. Représentation schématique de domaines de PLZF .....	16
Figure 5. Régulation transcriptionnelle par un facteur de transcription .....	20
Figure 6. Implication de PLZF dans la progression du cycle cellulaire.....	24
Figure 7. Rôle de PLZF dans le développement des membres postérieurs.....	27
Figure 8. Schématisation de l'hématopoïèse et de la spermatogénèse .....	29
Figure 9. Expression de la protéine PLZF dans les cellules épithéliales intestinales foetales et cancéreuses .....	57
Figure 10. Détection des formes épissées de l'ARNm de PLZF dans les cellules de tissus foetaux et dans les cellules cancéreuses colorectales humaines.....	59
Figure 11. Analyse de l'effet de divers inhibiteurs de protéases sur le statut de PLZF 65 kDa dans diverses lignées cancéreuses colorectales humaines .....	61
Figure 12. Identification d'un second site d'initiation de la traduction pour PLZF ...	62
Figure 13. Utilisation d'un second site d'initiation de la traduction <i>in vitro</i> .....	63
Figure 14. Utilisation d'un second site d'initiation de la traduction dans les cellules 293T .....	65
Figure 15. Transfection de PLZF étiqueté <i>Flag</i> dans les cellules 293T et immunoprécipitations avec les anticorps <i>Flag</i> et PLZF .....	67
Figure 16. Localisation de PLZF 65 kDa au niveau du cytosquelette des cellules Caco-2/15 .....	69

Figure 17. Localisation de PLZF 65 kDa au niveau du cytosquelette des cellules cancéreuses colorectales Colo205, T84 et DLD1 .....	70
Figure 18. Expression de PLZF 65 kDa au cours de la transition prolifération/différenciation des cellules Caco-2/15.....	72
Figure 19. Localisation de PLZF 65 kDa dans le cytosquelette des cellules épithéliales coloniques de souris .....	73

## II- Liste des tableaux

Tableau 1. Amorces utilisées pour l'amplification par PCR .....	44
Tableau 2. Cycles d'amplification par PCR .....	44
Tableau 3. Traitement de différentes lignées cellulaires avec des inhibiteurs de protéases.....	45
Tableau 4. Cycles d'amplification par PCR .....	48
Tableau 5. Conditions pour la détection de différents antigènes.....	53
Tableau 6. ADNs utilisés pour la transcription/traduction in vitro .....	54
Tableau 7. Anticorps utilisés pour les immunofluorescences .....	55

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

<b>ADNc</b>	Acide désoxyribonucléique complémentaire
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>B-CLL</b>	B-cell chronic lymphoid leukemia
<b>BID</b>	BH3 interacting domain death agonist
<b>BTB-POZ</b>	Bric-a-brac/Tramtrack/Broad complex - Poxvirus and Zinc finger
<b>Cdk</b>	Cyclin dependant kinase
<b>CDP</b>	CCAAT Displacement Protein
<b>DMEM</b>	Dulbecco Modified Eagle's Medium
<b>DMSO</b>	Diméthyl sulfoxide
<b>dNTP</b>	Déoxynucléotides triphosphate (N = A, T, C, G)
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic acid
<b>ETO</b>	Eight Twenty One
<b>FBS</b>	Sérum bovin foetal
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
<b>HAT</b>	Histone Acetyl Transferase
<b>HDAC</b>	Histone Deacetylase
<b>HEPES</b>	4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazineéthanesulfonate
<b>HIEC</b>	Human Intestinal Epithelial Cell
<b>KDa</b>	Kilodaltons
<b>KRP</b>	Tampon Krebs-Ringer-Phosphate
<b>mA</b>	milliampères

<b>mL</b>	millilitre
<b>mm</b>	millimètre
<b>MMP-9</b>	Matrix Metalloprotease 9
<b>mSin3A</b>	Mammalian Swi-Independant 3A
<b>NaF</b>	Fluorure de sodium
<b>NCoR</b>	Nuclear Corepressor
<b>nm</b>	Nanomètre
<b>PBS</b>	Tampon phosphate salin
<b>Pbx1</b>	pre-B-cell leukemia transcription factor 1
<b>PLZF</b>	Promyelocytic Leukemia Zinc Finger
<b>RAR<math>\alpha</math></b>	Récepteur de l'Acide Rétinoïque $\alpha$
<b>RD2</b>	Repression domain 2
<b>rpm</b>	Révolution par minute
<b>RT-PCR</b>	Reverse Transcriptase and Polymerase Chain Reaction
<b>SDS</b>	Sodium Dodecyl Sulfate
<b>shRNA</b>	short-hairpin ribonucleic acid
<b>SMRT</b>	Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid Hormone Receptor
<b>S-PEK</b>	ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit
<b>SUMO</b>	Small Ubiquitin-related modifier
<b>t(11;17)</b>	Translocation chromosomique implicant le chromosome 11 et le chromosome 17
<b>TEMED</b>	NNN'N'-tétraméthyléthylène diamine

## RÉSUMÉ

Identification d'une nouvelle forme du facteur de transcription PLZF et implication dans le maintien de l'épithélium intestinal

**Christine Jones**, Département d'anatomie et de biologie cellulaire, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke.

PLZF est un répresseur transcriptionnel de la famille des facteurs à doigts de zinc. Il fut d'abord identifié comme protéine de fusion suite à une translocation chromosomique impliquée dans une forme rare de la leucémie promyélocytique aiguë, résistante aux différents traitements incluant l'acide rétinoïque. PLZF est impliqué dans le maintien des cellules souches spermatogoniales et dans le maintien de l'état indifférencié des cellules progénitrices myéloïdes. Nous avons par le passé identifié PLZF comme une cible du répresseur transcriptionnel colonique CDP. Le rôle de PLZF dans l'épithélium intestinal demeure toutefois inconnu.

Notre hypothèse de départ était que PLZF pourrait être impliqué dans le contrôle de la prolifération de l'épithélium intestinal et dans le maintien de sa population souche. Un immunobuvardage de type Western a mené à la détection d'une forme écourtée de PLZF, soit d'environ 65 kDa, par rapport à la forme classique de 81 kDa. Une analyse détaillée du profil d'expression de PLZF dans diverses lignées cancéreuses colorectales humaines a démontré une forte expression de PLZF 65 kDa dans ces cellules, par rapport à l'expression dans les colonocytes fœtaux. De plus, une diminution de l'expression de PLZF 65 kDa dans les cellules épithéliales intestinales quiescentes (HIEC) fut observée. Une diminution a également été observée à l'atteinte de la confluence des cellules Caco-2/15, suggérant à nouveau une implication de PLZF 65 kDa dans la prolifération cellulaire et/ou dans le maintien de l'état indifférencié de ces cellules. Trois hypothèses furent par la suite avancées pour expliquer l'origine de PLZF 65 kDa : l'épissage alternatif, le clivage protéolytique, et la traduction à partir d'un second site d'initiation de la traduction. Une expérience de RT-PCR avec les messagers de lignées cancéreuses colorectales humaines n'a pas menée à l'identification d'une forme épissée pouvant expliquer l'origine de PLZF 65 kDa. Le traitement de ces différentes lignées cancéreuses colorectales avec différents inhibiteurs de protéases a également permis de rejeter l'implication de plusieurs protéases dans la production de PLZF 65 kDa. Une analyse détaillée de la séquence de PLZF a menée à l'identification d'un second site d'initiation de la traduction parfaitement conservé en fonction de la séquence consensus de Kozak et en aval du site d'initiation connu. La transfection d'un vecteur d'expression éliminant le premier ATG de PLZF et une expérience de transcription/traduction *in vitro* ont résulté en la production d'une protéine de 65 kDa. Une expérience d'immunoprécipitation avec une protéine PLZF étiquetée *Flag* est venue appuyer l'hypothèse de l'utilisation d'un second site d'initiation de la traduction. Des analyses ont ensuite été effectuées afin de vérifier si l'absence du domaine de répression et de localisation nucléaire BTB-POZ dans PLZF 65 kDa permettait toujours la localisation de la protéine au niveau du noyau. L'analyse par Western des protéines extraites suite au fractionnement des cellules cancéreuses et des cellules épithéliales normales de souris a permis de

constater que PLZF 65 kDa se retrouvait exclusivement au niveau du cytosquelette. Des co-immunolocalisations avec la cytokératine 18 ont ensuite confirmé cette observation.

Cette étude a démontré l'existence d'une nouvelle forme de la protéine PLZF, originant de la traduction à partir d'un second site d'initiation situé en aval de l'ATG classique. Les résultats suggèrent également que cette nouvelle forme de PLZF ne posséderait pas le domaine de répression BTB-POZ et qu'elle pourrait être impliquée dans différents processus cellulaires tels que la prolifération et/ou le maintien de l'état indifférencié des cellules épithéliales intestinales.



# **I- Introduction**

## **1. Anatomie du tube digestif**

Le tube digestif occupe une fonction essentielle dans l'organisme puisqu'il est responsable de la dégradation et l'absorption des nutriments, donc de l'apport en énergie (Radtke et Clevers, 2005 ; Wheater et al, 2001). Cinq étapes sont nécessaires pour l'accomplissement de ses fonctions : l'ingestion, la fragmentation, la digestion, l'absorption et l'élimination des produits de dégradation. L'intestin grêle est l'hôte de deux de ces cinq étapes vitales, soit d'une partie du processus de la digestion ainsi que l'absorption des nutriments. Le côlon, quant à lui, joue un rôle essentiel dans l'élimination en absorbant une partie de l'eau et des électrolytes contenus dans les résidus provenant de l'intestin grêle (Geibel, 2005 ; Wheater et al, 2001).

Trois segments composent l'intestin grêle soient le duodénum, qui est la partie proximale, le jéjunum, qui est le segment moyen ainsi que l'iléon, qui occupe la section distale. Plusieurs caractéristiques morphologiques et structurales de l'intestin grêle ont pour objectif d'augmenter grandement sa surface d'absorption, lui permettant ainsi d'être très efficace dans l'accomplissement de sa principale tâche. Sa longueur très importante et la présence de replis au niveau de la muqueuse et de la sous-muqueuse, appelés valvules conniventes, contribuent à l'augmentation de sa surface d'absorption. La muqueuse participe aussi à offrir un meilleur rendement en se présentant sous forme de projections digitiformes appelées villosités. À la surface apicale des cellules absorbantes, on retrouve

également des microvillosités, contribuant elles aussi à une absorption plus efficace par l'intestin grêle (Wheater et al, 2001).

## **2. L'épithélium intestinal**

L'intestin est composé de quatre couches fonctionnelles distinctes soit la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et l'adventice (Wheater et al, 2001). L'épithélium, qui est une monocouche de cellules en bordure de la lumière du tube et qui compose une partie de la muqueuse, est essentiel pour l'accomplissement des fonctions de l'intestin.

### **2.1 Épithélium de l'intestin grêle**

#### **2.1.1 Organisation et dynamique de l'axe crypte-villosité**

La crypte et la villosité forment ensemble l'unité fonctionnelle de l'intestin grêle. Au niveau de la villosité, on ne retrouve que des cellules complètement différenciées et non prolifératives (Sancho et al, 2004 ; Karam et al, 1999). Trois principaux types de cellules différenciées peuplent la villosité de l'intestin grêle. Les cellules absorbantes ont pour fonction la sécrétion d'hydrolases et l'absorption des nutriments. Les cellules à mucus (ou cellules caliciformes), qui sont présentes de façon plus importante dans la partie plus distale de l'intestin grêle, sécrètent un mucus protecteur pour l'épithélium (Sancho et al, 2004 ; Pinto et Clevers, 2005 ; Radtke et Clevers, 2005). Finalement, les cellules entéroendocrines, retrouvées en très faible proportion par rapport aux autres types de cellules épithéliales

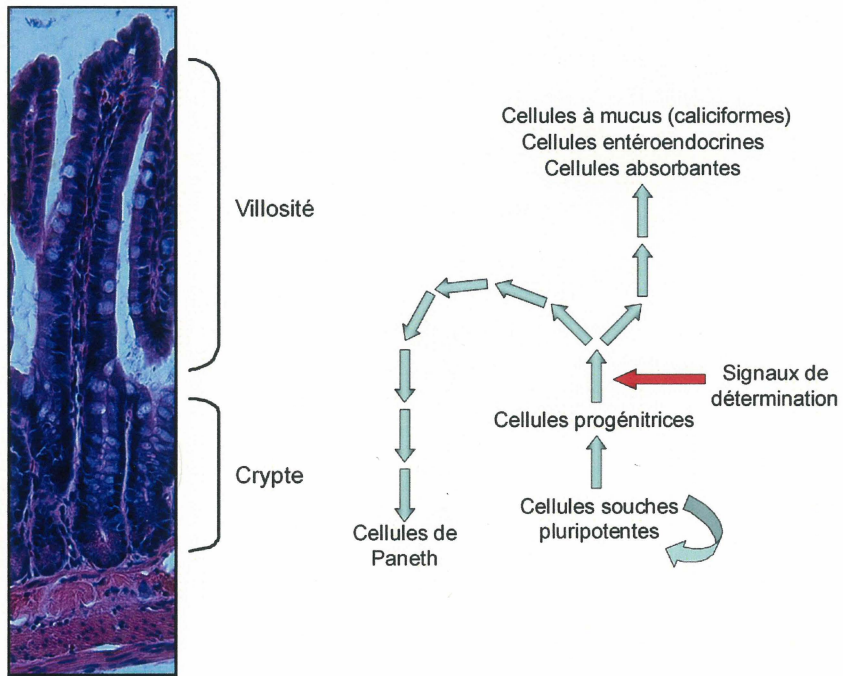
intestinales (moins de 1% des cellules totales de l'axe crypte-villosité) (Pinto et Clevers, 2005 ; Radtke et Clevers, 2005), ont pour rôle la sécrétion d'hormones telles que la sérotonine, la substance P et la sécrétine. Au fond de la crypte, se retrouvent les cellules de Paneth, des cellules différenciées qui ont pour rôle la sécrétion de peptides antimicrobiens et d'enzymes tels que les cryptidines, les défensines et le lysozyme (Pinto et Clevers, 2005 ; Sancho et al, 2004 ; Radtke et Clevers, 2005). C'est également au niveau de la base de la crypte, intercalées entre les cellules de Paneth et au-dessus, que se retrouvent les cellules souches multipotentes et indifférenciées à l'origine des autres types de cellules (Sancho et al, 2004). Les cellules souches se divisent pour produire de nouvelles cellules souches et/ou des cellules-filles progénitrices (Potten, 1998 ; Marshman et al, 2002 ; Okamoto et Watanabe, 2004). Ces cellules-filles prolifératives reçoivent des signaux de détermination et entament une migration vers le haut de la crypte (ou vers le bas dans le cas des cellules de Paneth) au cours de laquelle elles commencent leur processus de différenciation. Arrivée au tiers supérieur de la crypte, les cellules entament leur différenciation terminale, et c'est à ce moment qu'elles perdent leur capacité à proliférer. Finalement, à la jonction crypte-villosité, les cellules sont complètement différenciées et fonctionnelles. Afin de maintenir un équilibre dans le système, les cellules matures poursuivent leur ascension vers l'apex de la villosité, où elles meurent par apoptose environ 3 à 5 jours après la division initiale (à l'exception encore une fois des cellules de Paneth, qui se retrouvent au fond de la crypte) (Moore et Lemischka, 2006 ; Potten et Loeffler, 1990 ; Karam, 1999 ; Pinto et Clevers, 2005) (Figure 1A).

**Figure 1. Dynamique de l'épithélium intestinal.**

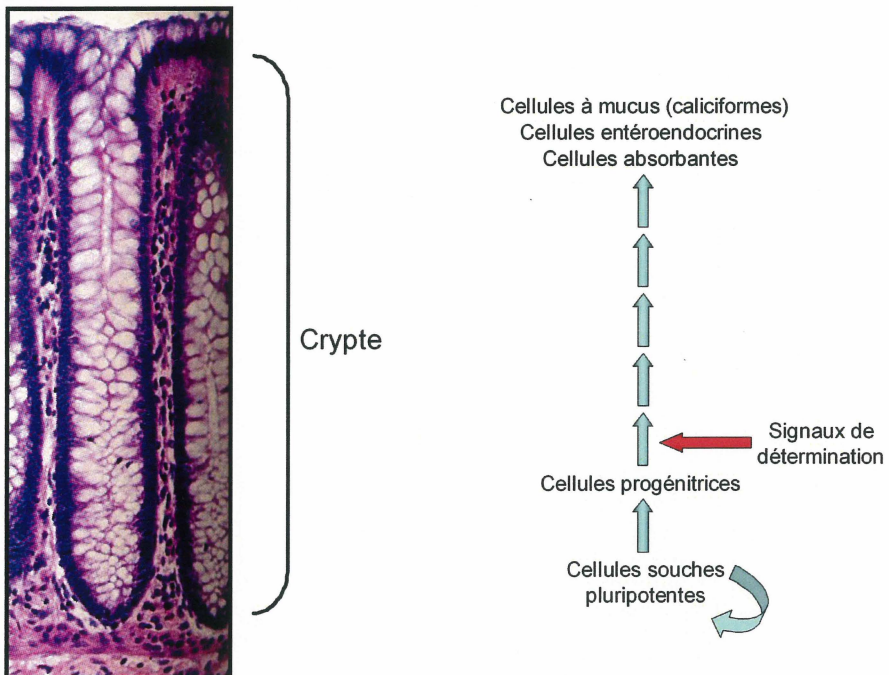
**A) Unité fonctionnelle de l'intestin grêle.** La crypte et la villosité sont les composantes de l'unité fonctionnelle de l'intestin grêle. Les cellules souches se trouvant au fond de la crypte vont subir plusieurs divisions cellulaires qui leur permettront de se renouveler et/ou donner naissance aux cellules progénitrices. Les cellules progénitrices déterminées à se différencier vont entamer une migration vers le haut ou vers le bas de la crypte, au cours de laquelle elles vont se différencier en un des quatre types cellulaires différenciés de l'intestin grêle, soit les cellules de Paneth, les cellules absorbantes, les cellules entéroendocrines et les cellules caliciformes. À l'exception des cellules de Paneth qui se retrouvent au fond de la crypte, les cellules procéderont à leur différenciation terminale dans le tiers supérieur de la crypte, et poursuivront leur ascension jusqu'à l'apex de la villosité, où elles mourront par apoptose.

**B) Unité fonctionnelle colonique.** L'unité fonctionnelle du côlon est composée d'une crypte et d'un épithélium de surface plat. Tout comme dans l'intestin grêle, ce sont les divisions des cellules souches au fond de la crypte qui permettront la production des cellules différenciées du côlon et le maintien de sa population souche. L'absence de cellules de Paneth au fond des cryptes du côlon porte à trois le nombre de types cellulaires différenciés présents dans ce segment: les cellules caliciformes, les cellules entéroendocrines et les cellules absorbantes. Comme c'est le cas dans l'intestin grêle, c'est au cours de leur migration que les cellules vont se différencier, et c'est à leur arrivée dans le tiers supérieur de la crypte colonique qu'elles seront pleinement différenciées. Elles mourront également par apoptose, mais cette fois-ci au niveau de l'épithélium de surface plat.

A



B



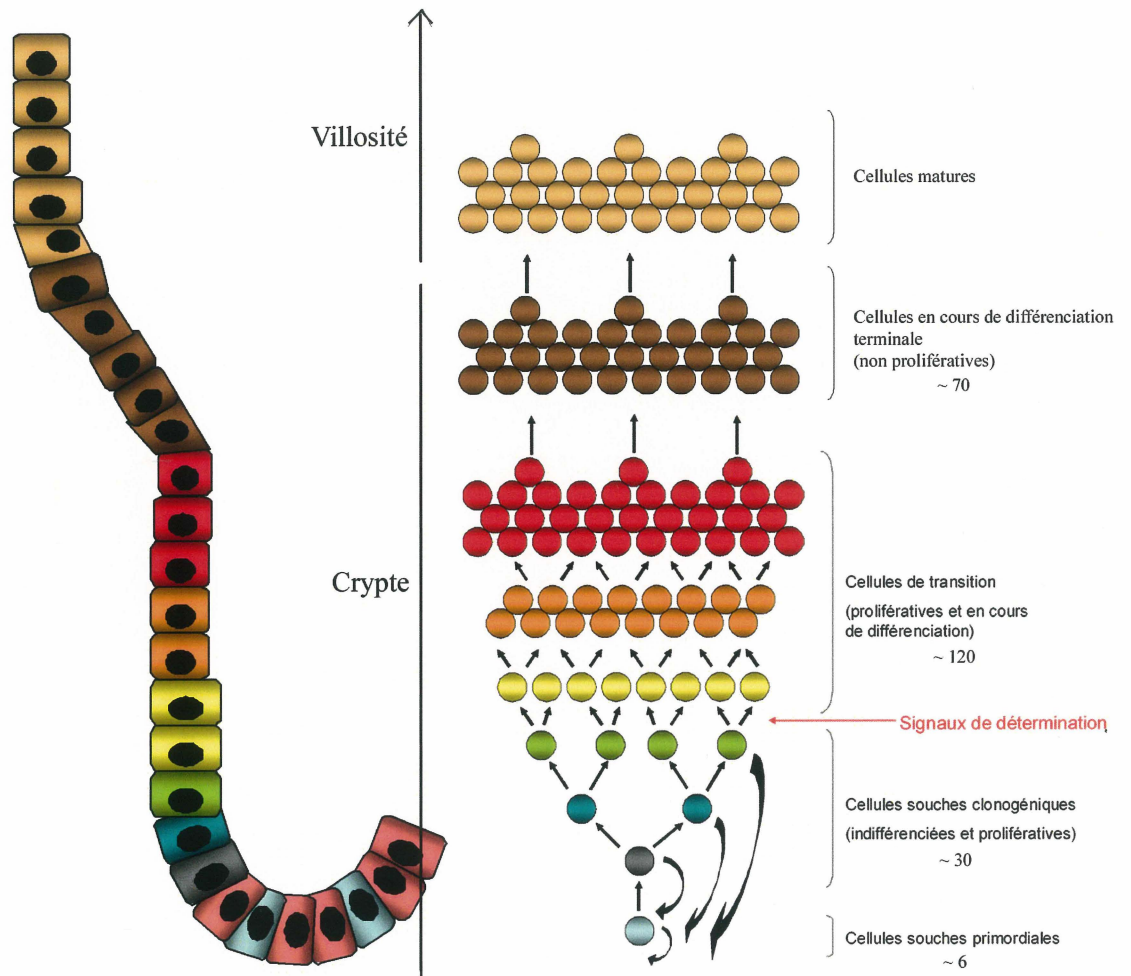
### 2.1.2 Les cellules souches

Pour qu'une cellule épithéliale intestinale soit considérée comme « cellule souche », elle doit répondre à certains critères. La cellule souche doit être d'origine monoclonale, conserver un phénotype indifférencié, posséder l'habileté à se diviser de façon asymétrique, doit être multipotente (c'est-à-dire, pouvoir donner naissance à n'importe quel type cellulaire différencié de l'intestin) et avoir un fort potentiel prolifératif à l'infini. La cellule souche doit également posséder la capacité de repeupler entièrement une crypte suite à une blessure et être ancrée à la base de la crypte, au niveau de la « niche » des cellules souches (Potten et Loeffler, 1990 ; Marshman et al, 2002 ; Pinto et Clevers, 2005 ; Sancho et al, 2004).

Les cellules répondant à tous ces critères sans exception sont appelées cellules souches primordiales. Elles sont représentées au nombre de quatre à six cellules par crypte (Potten et Loeffler, 1990 ; Moore et Lemischka, 2006 ; Potten, 1998 ; Booth et Potten, 2000). La capacité à se diviser de façon asymétrique leur permet de se renouveler, et aussi de donner naissance à des cellules-filles. Ces cellules-filles, appelées cellules souches clonogéniques, conservent la capacité de régénération cryptale en cas de blessure. Ces cellules prolifératives peuvent donc remplacer les cellules souches primordiales au besoin et ainsi, assurer la survie de la crypte. Leur nombre est estimé à une trentaine de cellules par crypte (trois générations). Une fois déterminées, les cellules souches clonogéniques perdent cette capacité de régénération épithéliale et deviennent les cellules de transition, des cellules prolifératives non-souches, en cours de différenciation (Potten, 1998 ; Booth et Potten, 2000 ; Marshman et al, 2002) (Figure 2).

**Figure 2. Hiérarchie de la population souche épithéliale intestinale.**

Les cellules souches primordiales sont des cellules multipotentes, indifférenciées et prolifératives se trouvant au fond de la crypte. Leur capacité à se diviser de façon asymétrique va leur permettre de maintenir leur population (qui est d'environ 6 cellules par crypte) et de donner naissance à des cellules-filles appelées cellules souches clonogéniques. Ces cellules, estimées à une trentaine par crypte, sont également indifférenciées, et prolifèrent à une cadence plus rapide que les cellules primordiales. Ce sont ces cellules qui recevront éventuellement des signaux de détermination et qui deviendront les cellules de transition, des cellules prolifératives en cours de différenciation.





L'environnement entourant les cellules souches est très important pour la régulation et le maintien de leur homéostasie. « La niche » est un ensemble de cellules et de substrats extracellulaires pouvant abriter une ou plusieurs cellules souches et réguler leurs fonctions (Spradling et al, 2001). Elle procure à la cellule souche un abri en la protégeant des différents stimuli qui pourraient mener, par exemple, à la différenciation ou à l'apoptose. Elle protège également l'épithélium intestinal contre la production excessive de cellules souches, pouvant mener potentiellement à la formation d'un cancer (Moore et Lemischka, 2006). L'importance de la niche est telle qu'une cellule souche hors de sa niche perd son caractère multipotent (Spradling et al, 2001).

L'utilisation des cellules souches saines pour le traitement de différentes maladies est très prometteuse (McDonald et al, 2006). Malheureusement, l'absence de marqueur(s) spécifique(s) connu(s) pour les cellules souches épithéliales intestinales et l'incapacité de les différencier morphologiquement des autres cellules épithéliales rendent leur étude très difficile (Marshman et al, 2002).

## 2.2 Le côlon

### 2.2.1 Organisation et dynamique de la crypte colonique

Contrairement à l'intestin grêle, l'unité fonctionnelle colonique ne comprend pas de villosités, mais des cryptes et un épithélium de surface plat (Sancho et al, 2004 ; Karam, 1999 ; Pinto et Clevers, 2005). Par contre, les types de cellules retrouvées au niveau du côlon sont similaires à ceux retrouvés au niveau de

l'intestin grêle. On retrouve au niveau de l'épithélium de surface et du tiers supérieur de la crypte les cellules absorbantes, les cellules caliciformes ainsi que les cellules entéroendocrines. Les cryptes du côlon ne possèdent pas de cellules de Paneth. Ce sont plutôt les cellules souches qui peuplent la base des cryptes. La dynamique au sein des cryptes est sensiblement la même que celle observée dans l'intestin grêle. Les cellules souches prolifèrent, et les cellules filles reçoivent des signaux de détermination, migrent et entament un processus de différenciation, pour finalement cesser de proliférer et être complètement différenciées à leur arrivée dans le tiers supérieur de la crypte. Tout comme dans l'intestin grêle, les cellules vont terminer leur vie à la surface en mourant par apoptose, mais cette fois-ci, 5 à 21 jours après leur division initiale (Karam, 1999) (Figure 1B).

#### 2.2.2 Le cancer colorectal

Les tumeurs colorectales résultent de l'activation d'oncogènes combinée à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs, qui surviennent suite à certaines mutations génétiques. Une accumulation de plusieurs mutations de gènes est requise pour le développement tumoral (Radtke et Clevers, 2005). Une des théories d'actualité est que la cellule souche, qui est un élément vital pour le maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal, pourrait être hautement responsable du développement de tumeurs colorectales. Certaines caractéristiques de ce type de cellule la rendent susceptible à l'accumulation de mutations pouvant mener à l'initiation de la carcinogénèse colonique. La très longue durée de vie, la capacité d'auto-renouvellement et le fort potentiel prolifératif font de celle-ci une candidate

idéale pour l'apparition et l'accumulation de mutations spontanées (McDonald et al, 2006).

Mais pourquoi n'y a-t'il pratiquement pas de cancer au niveau de l'intestin grêle et ce, malgré la présence de cellules souches ? Les cellules souches de l'intestin grêle ont la caractéristique particulière d'afficher des mécanismes de protection contre les erreurs et les dommages à l'ADN. Tout d'abord, il semblerait que cette cellule, lors de sa division, aurait la capacité de toujours conserver le brin matrice, et transmettrait automatiquement le brin nouvellement synthétisé à la cellule-fille, qui entamera prochainement son processus de différenciation. De cette façon, la cellule souche s'assure de ne jamais conserver un brin pouvant potentiellement contenir des erreurs. Si des erreurs sont apparues lors de la synthèse du nouveau brin, elles seront éliminées 5 à 7 jours plus tard, suite à l'apoptose de la cellule à l'apex de la villosité (Marshman et al, 2002 ; McDonald et al, 2006). Chez les cellules souches de l'intestin grêle, on retrouve également un phénomène d'apoptose spontané, qui permet à l'épithélium de se débarrasser des cellules souches en excès et des cellules possédant des dommages irréparables à l'ADN (Booth et Potten, 2000 ; Potten, 1998).

L'épithélium colonique est extrêmement exposé à différentes substances dommageables pour l'ADN. Si ce dernier possédait le même type de protection que l'intestin grêle, il serait en constant renouvellement, donc le taux de prolifération de ses cellules souches serait extrêmement élevé. Une prolifération rapide augmenterait davantage le risque de voir apparaître des mutations et de mener au développement d'un cancer (Marshman et al, 2002). Par contre,

l'absence de ces différents mécanismes de protection au niveau des cellules souches du côlon entraîne une forte augmentation de l'incidence des cancers au niveau de ce segment de l'intestin, par rapport à l'incidence des cancers retrouvés au niveau de l'intestin grêle (Potten, 1998 ; McDonald et al, 2006).

### 2.3 Les modèles cellulaires épithéliaux de l'intestin

Plusieurs processus sont essentiels au maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal. La prolifération, la détermination, la migration, la différenciation et l'apoptose sont tous des phénomènes qui participent à la dynamique et à l'équilibre des unités fonctionnelles intestinales. Malheureusement, les études effectuées en utilisant les animaux de laboratoire ne sont pas toujours directement transposables à l'humain (Perreault et Beaulieu, 1996 ; Pageot et al, 2000). Les modèles cellulaires en culture sont donc nécessaires afin de mieux comprendre le fonctionnement et la régulation de ces différents processus au niveau moléculaire.

#### 2.3.1 Modèle pour l'étude de la différenciation épithéliale intestinale du grêle

La lignée cellulaire Caco-2 est un excellent modèle pour l'étude du processus de différenciation épithéliale intestinale et de ses mécanismes de régulation. Cette lignée fut isolée à partir d'un adénocarcinome de côlon humain (Fogh et al, 1977). Dans des conditions de culture normales, ces cellules forment une monocouche à l'atteinte de la confluence. Lors d'une culture post-confluente de 20 à 40 jours, les cellules Caco-2 acquièrent graduellement une polarité morphologique et une

bordure en brosse typique des entérocytes fonctionnels. On peut également remarquer la présence de complexes jonctionnels entre les cellules avoisinantes (Pinto et al, 1983 ; Pageot et al, 2000). Dans ces cultures post-confluentes, il y a également induction de l'expression de différentes dissacharidases et peptidases typiques des entérocytes matures de l'intestin grêle, telles que la sucrase-isomaltase et la lactase-phlorizin hydrolase (Hauri et al, 1985 ; Beaulieu et Quaroni, 1991). Plusieurs clones ont été isolés dans le but d'étudier les facteurs qui régulent l'expression de la sucrase-isomaltase et qui sont responsables de sa distribution mosaïque dans les cultures confluentes de cellules Caco-2. Les cellules du clone Caco-2/15 furent caractérisées comme étant des cellules qui expriment fortement la sucrase-isomaltase (Beaulieu et Quaroni, 1991).

### 2.3.2 Modèle pour l'étude de la prolifération épithéliale normale de l'intestin grêle

La lignée épithéliale intestinale HIEC-6 (Human Intestinal Epithelial Cell) fut isolée à partir de cryptes d'iléon fœtal humain normal, par la technique utilisant la thermolysine comme enzyme de dissociation épithéliale (Perreault et Beaulieu, 1996). Ce modèle unique en est un de choix pour l'étude de plusieurs processus cellulaires associés à la crypte tels que la prolifération des cellules épithéliales intestinales. En plus d'avoir l'avantage de provenir de tissu humain, ces cellules ne sont pas d'origine cancéreuse et ne sont pas immortalisées en culture (Perreault et Beaulieu, 1996).

### 2.3.3 Modèles de cellules cancéreuses colorectales humaines

Les lignées cellulaires provenant d'adénocarcinomes colorectaux telles que les Colo205, les Caco-2/15 et les DLD-1, ainsi que de carcinomes colorectaux telles que les HCT-116 et les T84 (American Type Culture Collection ; [www.atcc.org](http://www.atcc.org)), sont d'excellents modèles pour l'étude des différents processus et leurs dérégulations dans les cancers. Ces lignées, toutes d'origine épithéliale, possèdent un fort potentiel prolifératif et leur injection dans les souris nues mène toute à la formation de tumeurs (Trainer et al, 1988 ; [www.atcc.org](http://www.atcc.org)). L'expression altérée d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeur contribue au phénotype cancéreux de ces lignées. Par exemple, une analyse Northern a permis de constater l'expression de différents oncogènes tels que *c-myc*, *H-ras*, *K-ras*, *N-ras*, *myb*, *fos*, *sis* et *p53* dans les cellules DLD-1 (Trainer et al, 1988).

## 3. Le facteur de transcription PLZF (*Promyelocytic Leukemia Zinc Finger*)

### 3.1 Généralités

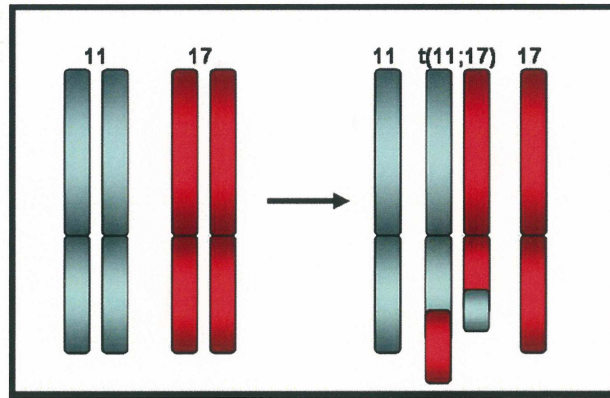
Les translocations chromosomiques sont fréquemment associées au développement de malignités du système hématopoïétique chez l'humain. La caractérisation moléculaire de translocations chromosomiques associées à une leucémie promyélocytique aiguë résistante à la thérapie a mené le groupe de Zelent et ses collaborateurs à découvrir la translocation t(11 ;17)(q23 ;q21) impliquant le locus du gène codant pour le récepteur de l'acide rétinoïque  $\alpha$  et un gène codant pour une protéine à doigts de zinc qui était jusque là inconnue (Figure 3A) (Chen

**Figure 3. Représentation schématique du répresseur transcriptionnel PLZF.**

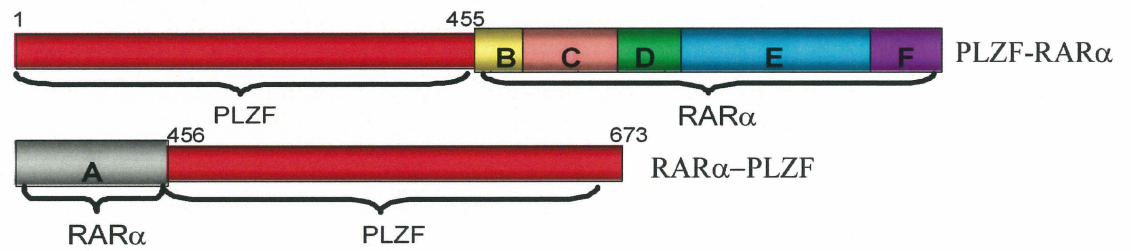
**A) Translocation t(11 ;17) impliquée dans la leucémie promyélocytique aiguë.** La translocation chromosomique t(11 ;17)(q23 ;q21) donne naissance à deux protéines de fusion réciproques, soit PLZF-RAR $\alpha$  et RAR $\alpha$ -PLZF. L'identification de cette translocation a permis la découverte d'un nouveau facteur de transcription, le répresseur PLZF.

**B) Structure de la protéine PLZF.** Le répresseur PLZF est composé de 3 domaines majeurs, soit le domaine BTB/POZ, le domaine RD2 et un motif contenant 9 doigts de zinc. Le domaine BTB/POZ et le domaine RD2 médient la répression transcriptionnelle par PLZF via le recrutement d'un complexe multiprotéique corépresseur, alors que les doigts de zinc servent à la liaison séquence spécifique à l'ADN.

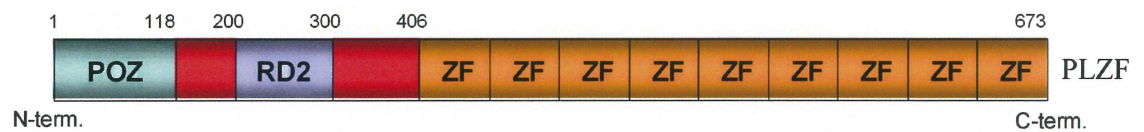
## A Translocation t(11;17) (q23;q21)



t(11;17) (q23;q21)



## B Structure de la protéine PLZF





et al, 1993). Cette nouvelle protéine de 673 acides aminés (81 kDa) fut nommée « PLZF », pour Promyelocytic Leukemia Zinc Finger. La translocation t(11 ;17)(q23 ;q21) résulte en la production de deux réciproques protéiques, soient PLZF-RAR $\alpha$  et RAR $\alpha$ -PLZF, qui sont exprimées chez les patients atteints de cette forme résistante de leucémie promyélocytaire (Chen et al, 1993 ; Costoya et Pandolfi, 2001).

Le gène codant pour la protéine PLZF est très conservé dans l'évolution, soit de la levure à l'humain, et possède six exons et cinq introns. Au moins quatre sites d'épissage ont été identifiés et ce, seulement à l'intérieur de l'exon 1. L'expression des différentes formes épissées de PLZF est spécifique aux tissus, c'est-à-dire que la présence de ces différentes formes varie en fonction du tissu étudié. Hypothétiquement, la traduction à partir de l'une de ces séquences épissées pourrait résulter en l'apparition d'une protéine dans laquelle certains domaines sont altérés, comme par exemple, le domaine BTB-POZ (*Bric-a-brac/Tramtrack/Broad complex - Poxvirus and Zinc Finger*) (Zhang et al, 1999). Par contre, jusqu'à maintenant, aucune corrélation directe entre la présence d'une forme épissée de la séquence et l'apparition d'une protéine plus courte n'a été soulevée dans la littérature.

### 3.2 Les domaines de PLZF

La protéine PLZF possède trois domaines fonctionnels principaux, soit un domaine BTB-POZ, un domaine de répression appelé RD2 (*Repression Domain* 2), ainsi qu'un domaine possédant neuf doigts de zinc (Figure 3B).

### 3.2.1 Le domaine BTB-POZ

Le motif BTB/POZ est un domaine de répression très conservé dans l'évolution et est souvent associé à des motifs en doigt de zinc (Li et al, 1997 ; Ahmad et al, 1998). Il occupe la région N-terminale de la protéine et comprend les acides aminés 1 à 120 (Melnick et al, 2000 ; Ahmad et al, 1998). C'est via ce domaine que PLZF s'homodimérise pour former une structure comportant une poche chargée (Figure 4A) (Ahmad et al, 1998 ; Melnick et al, 2000 ; Melnick et al, 2002). Celle-ci permettra le recrutement direct des différents corépresseurs transcriptionnels tels que N-CoR, SMRT et Sin3A (Hong et al, 1997 ; Wong et Privalsky, 1998 ; David et al, 1998 ; Melnick et al, 2002). En plus d'être essentiel à la dimérisation et à la fonction répressive de PLZF via le recrutement d'un complexe protéique de corépression, le motif BTB/POZ est requis pour la localisation nucléaire ponctuée de la protéine (Melnick et al, 2000 ; Dong et al, 1996 ; Koken et al, 1997).

### 3.2.2 Le domaine RD2

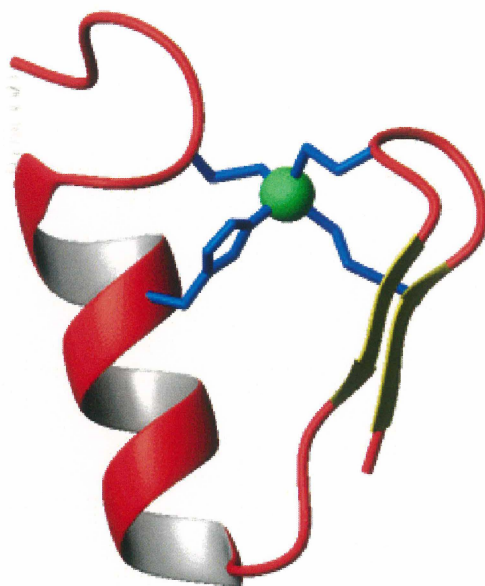
Le domaine RD2, pour *Repression Domain 2*, comprend les acides aminés en position 200 à 300, ce qui le situe entre le domaine BTB/POZ et les 9 motifs à doigt de zinc de PLZF (Figure 3B). Aucun motif protéique connu n'a d'homologie avec ce domaine (Li et al, 1997). Son rôle est encore très peu défini, mais quelques études ont permis de l'impliquer dans la répression transcriptionnelle médiée par PLZF (Melnick et al, 2000b ; Kang et al, 2003).

**Figure 4. Représentation schématique de domaines de PLZF.**

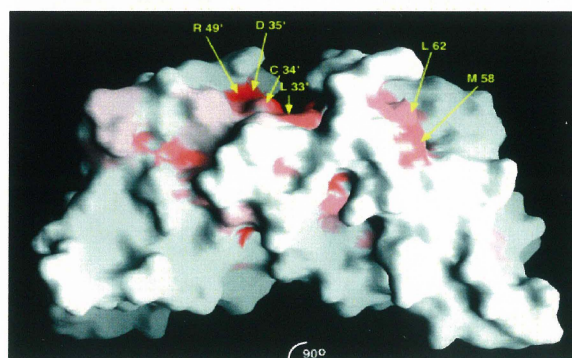
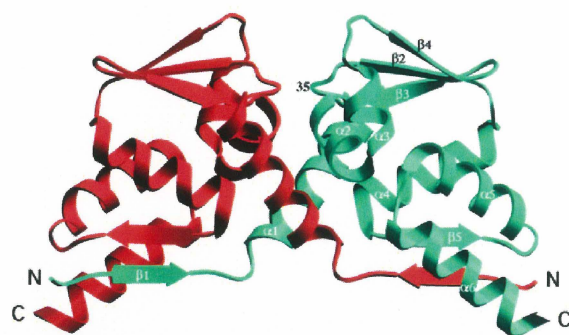
**A) Exemple de structure en doigts de zinc.** La structure en doigt de zinc se caractérise par une chaîne de plusieurs acides aminés repliée autour d'un atome de zinc. Ce type de motif est présent 9 fois dans le répresseur PLZF (Figure tirée du site internet [www.mmb.usyd.edu.au/mckay/selfdir2.php?gotolink=strucgall.imag](http://www.mmb.usyd.edu.au/mckay/selfdir2.php?gotolink=strucgall.imag)).

**B) Dimère de domaines BTB/POZ et formation de la poche chargée.** Le domaine BTB/POZ de PLZF permet son homodimérisation et donc la formation de la poche chargée, dont l'intégrité est essentielle pour le recrutement des différents corépresseurs (Melnick et al, 2000).

A Exemple de structure en doigt de zinc



B Représentation d'un dimère de domaines BTB/POZ et formation de la poche chargée



Tout comme le domaine de répression BTB/POZ, le domaine RD2 permet le recrutement de corépresseurs au niveau du promoteur cible. Ce second domaine de répression est essentiel pour l'interaction de PLZF avec la protéine ETO (*Eight-Twenty One*), une protéine n'ayant pas la capacité de lier l'ADN mais ayant l'habileté de s'associer elle-même aux corépresseurs N-CoR, SMRT et Sin3A, ainsi qu'aux histones désacétylases (HDAC) 1 et 2. De cette façon, le domaine RD2 participe lui aussi à la fonction répressive de PLZF en permettant le recrutement d'un complexe multiprotéique de répression au niveau des promoteurs ciblés (Melnick et al, 2000b).

Le domaine RD2 peut également subir une modification post-traductionnelle permettant de favoriser la répression transcriptionnelle par PLZF. SUMO-1 est conjugué de façon covalente à la lysine 242 du domaine RD2, ce qui augmente l'activité de liaison de PLZF à l'ADN, améliorant par le fait même la répression par ce facteur de transcription. (Kang et al, 2003).

### 3.2.3 Les 9 doigts de zinc

PLZF possède 9 motifs en doigt de zinc, qui se caractérisent par une chaîne de plusieurs acides aminés repliée autour d'un atome de zinc (Figure 4B). Ils sont situés complètement en C-terminal de la protéine et comprennent les acides aminés 406 à 673. Ce type de domaine est retrouvé dans de nombreuses protéines régulatrices de gènes et est responsable des interactions protéine-ADN. La liaison à l'ADN est une fonction essentielle pour qu'un répresseur transcriptionnel tel que PLZF puisse effectuer son rôle. Dans le cas de PLZF, c'est via ses 7 derniers

doigts de zinc que la liaison à l'ADN se fait de façon séquence-spécifique (Li et al, 1997). Par contre, les 2 doigts de zinc les plus en N-terminal ne sont pas sans fonction. Il semblerait que leur présence permettrait d'augmenter la répression transcriptionnelle médiée par PLZF (Dong et al, 1996), mais le mécanisme précis pour cette action n'est toujours pas élucidé.

Le 9<sup>e</sup> doigt de zinc de PLZF est également un site important d'acétylation par l'histone acétyl transférase (HAT) p300. Les HATs ont pour fonction générale d'acétyler les histones, mais elles ont également la capacité de modifier d'autres types de protéines tels que les facteurs de transcription. Elles jouent donc un rôle dans la régulation de l'expression génique en modifiant l'activité de certaines protéines régulatrices. PLZF est un substrat direct et spécifique de p300, et c'est au niveau des lysines en position 647, 650 et 653 qu'il est principalement acétylé. Cette acétylation aurait pour rôles d'augmenter l'affinité de PLZF pour l'ADN et de localiser correctement PLZF au niveau des corps nucléaires. L'acétylation de PLZF par p300 n'affecte donc pas sa capacité à recruter les complexes multiprotéiques de répression, mais est requise pour une liaison efficace à l'ADN (Guidez et al, 2005). En plus d'avoir pour fonction principale la liaison à l'ADN, les doigts de zinc contribueraient à stabiliser l'interaction avec les corépresseurs SMRT et Sin3A, ainsi qu'avec la désacétylase HDAC1. Leur présence est cruciale pour une activité répressive efficace (Wong et Privalsky, 1998).

### 3.3 La répression transcriptionnelle par PLZF

La régulation transcriptionnelle d'un gène peut se faire via l'activation ou l'inactivation de ce dernier. La balance entre ces différents états est possible grâce, entre autres, à l'ajout ou le retrait de groupements acétyl à la queue N-terminale des histones, par les histones acétyl transférases (HAT) ou les histones désacétylases (HDAC), respectivement. L'acétylation des histones par les HATs entraîne une déstabilisation de la structure de la chromatine, ce qui rend l'ADN accessible pour la machinerie transcriptionnelle. Dans cet état, le gène est transcriptionnellement actif. Par contre, la désacétylation de la queue des histones suite au recrutement des HDACs mène à une condensation de la chromatine. Le gène est alors transcriptionnellement inactif, puisque l'ADN n'est plus accessible pour la machinerie transcriptionnelle (Figure 5A) (Alberts et al, 2004).

PLZF est un facteur de transcription répresseur, ce qui signifie qu'il module l'expression d'un gène en le régulant de façon négative. L'habileté à recruter physiquement des protéines auxiliaires est cruciale puisque ce type de régulation requiert un contrôle local de la conformation de la chromatine par les HDACs (Wong et Privalsky, 1998 ; Dhordain et Albagli, 1998 ; David et al, 1998).

La composition du complexe multiprotéique de répression recruté par PLZF et l'ordre de recrutement de ses différentes composantes ne sont pas totalement élucidés. Les études effectuées jusqu'à maintenant suggèrent que l'homodimérisation de PLZF via son domaine BTB/POZ mènerait à la formation d'une structure appelée « poche chargée » (Ahmad et al, 1998 ; Melnick et al,

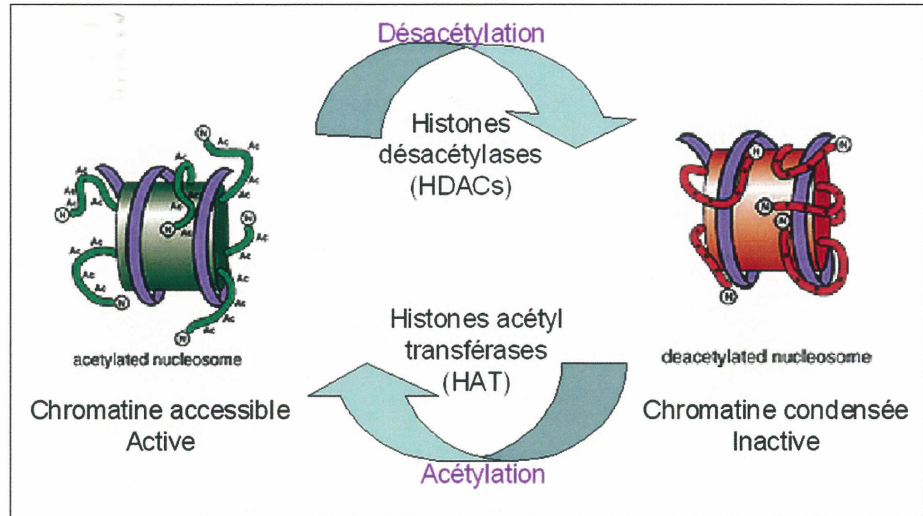
**Figure 5. Régulation transcriptionnelle par un facteur de transcription.**

**A) Régulation transcriptionnelle par les HATs et les HDACs.** Un gène peut se trouver dans un état transcriptionnellement actif ou inactif. La modulation entre ces deux états se fait grâce au recrutement de protéines ayant la capacité de modifier localement la structure de la chromatine. Les HATs ont la capacité d'acétyler la queue des histones, ce qui déstabilise la structure de la chromatine, rendant l'ADN accessible à la machinerie transcriptionnelle. Dans cet état, le gène est considéré comme transcriptionnellement actif. Dans le cas où il y a plutôt répression transcriptionnelle, ce sont les HDACs qui sont recrutées. Elles ont la capacité de désacétyler la queue des histones, entraînant une condensation de la chromatine. Dans cet état, l'ADN n'est plus accessible pour la machinerie transcriptionnelle.

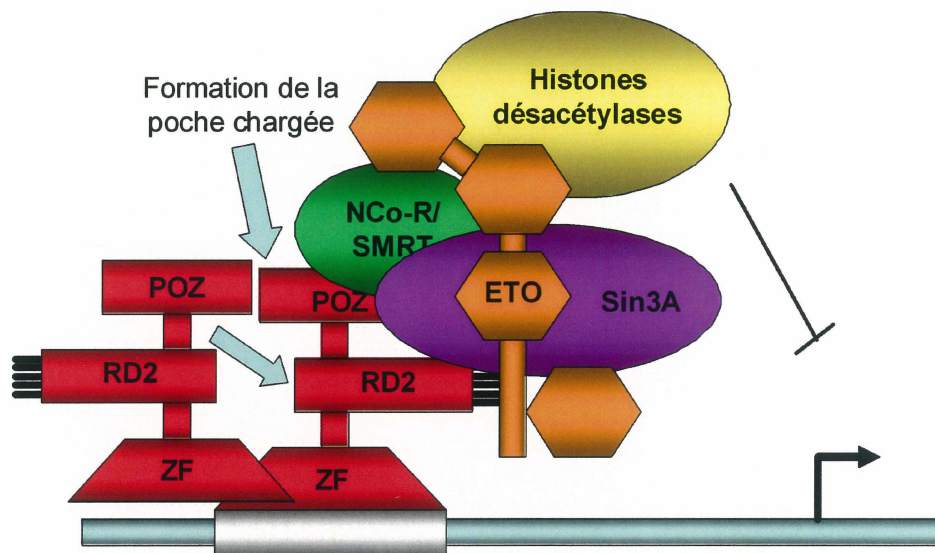
**B) Répression transcriptionnelle médiée par PLZF.** La dimérisation de la protéine PLZF va entraîner la formation d'une structure composée d'une poche chargée. C'est la formation de cette poche qui permettra le recrutement de corépresseurs tels que N-CoR, SMRT, Sin3A et ETO. Ce complexe protéique peut ensuite recruter les HDACs, qui désacétylent la queue des histones, causant une condensation de la chromatine, et donc, la répression de la transcription (Figure modifiée à partir de Melnick et al, 2000b).



A



B



2000a ; Melnick et al, 2002). C'est l'intégrité de cette poche chargée et l'exactitude de l'alignement de ses charges qui permettront le recrutement des corépresseurs N-CoR, SMRT et Sin3A par le domaine BTB/POZ et du corépresseur ETO par le domaine RD2 (Wong et Privalsky, 1998 ; Melnick et al, 2002 ; Hong et al, 1997 ; David et al, 1998 ; Melnick et al, 2000b ; Puccetti et al, 2005). Ces différentes interactions seront stabilisées en partie par la présence des doigts de zinc, ainsi que par les multiples contacts entre les protéines (Wong et Privalsky, 1998 ; Melnick et al, 2000b). Le complexe PLZF-corépresseurs recrutera ensuite les HDACs, qui permettront une désacétylation des histones menant à la répression transcriptionnelle du gène cible (Figure 5B). Le recrutement des désacétylases peut se faire de façon directe, via le domaine BTB/POZ de PLZF, ou via des interactions avec différents corépresseurs tels que N-CoR, SMRT, Sin3A et ETO (Melnick et al, 2002 ; Chauchereau et al, 2004; Wong et Privalsky, 1998 ; David et al, 1998 ; Melnick et al, 2000-2). Jusqu'à maintenant, ce sont les HDACs 1 et 4 qui ont été identifiées comme composantes du complexe corépresseur lié à PLZF. Ceci suggère que les HDAC de classe I et II peuvent coexister dans un même complexe (David et al, 1998 ; Wong et Privalsky, 1998 ; Chauchereau et al, 2004).

### 3.4 Fonctions du répresseur transcriptionnel PLZF

PLZF fait partie de la famille de protéines POZ-ZF, des protéines possédant à la fois un domaine BTB/POZ et un ou des motifs en doigt de zinc. Ce type de protéine est impliqué dans plusieurs processus biologiques incluant la détermination des cellules B, la réponse aux dommages à l'ADN, la progression du

cycle cellulaire, et une multitude d'événements développementaux tels que la gastrulation, la formation des membres et la détermination des cellules souches hématopoïétiques (Kelly et Daniel, 2006).

#### 3.4.1 Implication de PLZF dans la régulation du cycle cellulaire des cellules myéloïdes

Plusieurs études menées jusqu'à ce jour suggèrent que le facteur de transcription PLZF est étroitement lié à la régulation négative du cycle cellulaire dans les cellules myéloïdes. Une expression ectopique de ce répresseur dans différentes lignées cellulaires myéloïdes mène à l'arrêt du cycle cellulaire en G1, ce qui permet le maintien des cellules dans un état quiescent (McConnell et al, 2003 ; Yeyati et al, 1999 ; Shaknovich et al, 1998). Plusieurs gènes codant pour des protéines régulatrices du cycle cellulaire pourraient être ciblés et réprimés par PLZF et ainsi mener à ce type de blocage de la croissance cellulaire. Il semblerait néanmoins que c'est via la répression de c-myc et de la cycline A2 que PLZF jouerait son rôle de régulateur négatif du cycle cellulaire. La cycline A2 est essentielle pour l'entrée en phase S. La diminution de son expression chez les cellules exprimant PLZF entraîne un délai dans leur entrée dans cette phase (Yeyati et al, 1999). c-myc est un régulateur négatif de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21. Une diminution de c-myc entraîne une augmentation de p21, et donc un arrêt du cycle cellulaire en G1 (Figure 6). c-myc et la cycline A2 sont des cibles directes de PLZF, puisque ce dernier a la capacité de lier et de réprimer directement leur promoteur (McConnell et al, 2003 ; Yeyati et al, 1999). Malgré le fait que la régulation à la baisse de ces deux protéines soit un événement

moléculaire critique pour la répression de la croissance cellulaire par PLZF, il est à noter qu'il n'est pas exclu que PLZF pourrait aussi affecter l'expression de d'autres protéines régulatrices du cycle cellulaire.

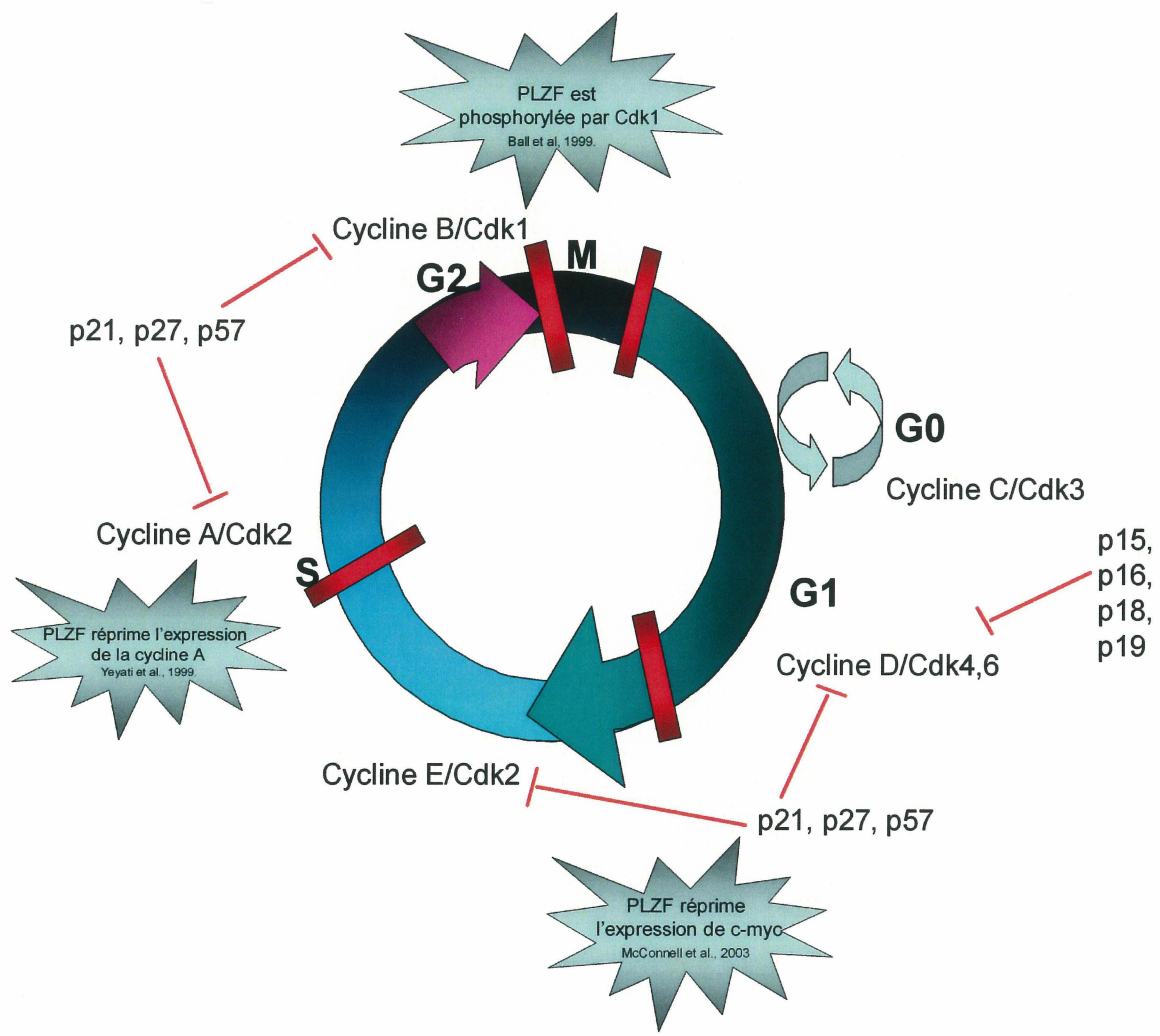
En plus de réguler la progression du cycle cellulaire, il a été démontré que l'activité de PLZF peut être elle-même modulée par la progression de ce cycle. La kinase Cdk1 interagit avec PLZF et le phosphoryle, ce qui augmente son habileté à lier l'ADN (Ball et al, 1999). Cette phosphorylation contribuerait elle aussi à l'arrêt du cycle cellulaire en G1, puisque celle-ci, en augmentant la liaison de PLZF à l'ADN, permettrait une plus forte répression de ses cibles, telles que la cycline A2 et c-myc.

#### 3.4.2 PLZF et le cancer

Lorsque PLZF forme une protéine de fusion avec RAR $\alpha$ , il entraîne le développement d'une forme rare de la leucémie promyélocytique aiguë, résistante aux traitements utilisant l'acide rétinoïque (Chen et al, 1993). Par contre, la protéine PLZF seule est impliquée dans le ralentissement de la prolifération cellulaire (McConnell et al, 2003 ; Yeyati et al, 1999) et posséderait donc plutôt un rôle de suppresseur de tumeur. C'est du moins le cas dans les tumeurs solides telles que les mélanomes, dans lesquels il n'y a pas ou très peu d'expression de PLZF, contrairement aux mélanocytes normaux. Une expression ectopique de PLZF dans différentes lignées cellulaires de mélanomes entraîne une diminution de l'agressivité du phénotype cancéreux (Felicetti et al, 2004). Cet effet anti-tumorigénique serait médié par la modulation de différentes cibles identifiées par

**Figure 6. Implication de PLZF dans la progression du cycle cellulaire.**

La surexpression de PLZF mène à un arrêt du cycle cellulaire en G1. Cette conséquence peut être en partie expliquée par le fait que PLZF est un répresseur transcriptionnel direct de la cycline A2 et de c-myc. PLZF peut également être phosphorylé par la kinase Cdk1, ce qui augmente son affinité pour l'ADN.



micropuce à ADN, telles que l'intégrine  $\alpha v \beta 3$  et la métalloprotéinase MMP-9, toutes deux impliquées dans la progression et l'invasion des mélanomes (Felicetti, et al, 2004), ainsi que le facteur Pbx1, impliqué dans la prolifération des cellules de mélanomes (Shiraishi et al, 2007).

### 3.4.3 Implication de PLZF dans le développement

Différentes études utilisant des souris invalidées pour le gène *Plzf* ont permis d'illustrer un rôle important pour ce facteur dans le développement des membres postérieurs, du squelette axial et du système nerveux central (Cook et al, 1995 ; Barna et al, 2005 ; Barna et al, 2000 ; Avantaggiato et al, 1995 ; Barna et al 2002).

Le contrôle précis de la prolifération durant le développement est essentiel pour la croissance normale des membres, et l'apoptose interdigitale est un pré-requis pour la bonne séparation des doigts. Les membres des vertébrés se développent initialement comme un bourgeon de cellules mésenchymateuses. Les cellules se trouvant à l'apex du bourgeon prolifèrent rapidement, alors que les cellules à la base s'agrègent dans une séquence proximo-distale, pour donner naissance à des condensations cartilagineuses qui formeront éventuellement les composants squelettiques des membres (Barna et al, 2005 ; Barna et al, 2000). Les souris invalidées pour *Plzf* montrent un délai significatif dans la régression du mésenchyme interdigital et une augmentation de la prolifération cellulaire. Des défauts au niveau de l'axe antéro-postérieur des membres arrières sont également observés. La transformation de structures squelettiques antérieures par des structures postérieures est fréquemment observée. Une dérégulation (dans ce cas-

ci, une antériorisation) de l'expression des gènes Hox et des gènes Bmp chez les souris mutantes serait une cause probable des anomalies développementales observées (Figure 7). Dans les membres en développement, PLZF agit donc comme inhibiteur de croissance, facteur pro-apoptotique et régulateur de l'expression des gènes Hox et Bmp (Barna et al, 2000). Une étude plus récente a de plus démontré que PLZF est un régulateur négatif direct de l'expression du gène HoxD11 (Barna et al, 2002). PLZF est également essentiel pour la liaison de Bmi-1 à l'ADN. Bmi-1 est un répresseur transcriptionnel de la famille des Polycomb, des protéines régulatrices des gènes Hox. (Barna et al, 2002).

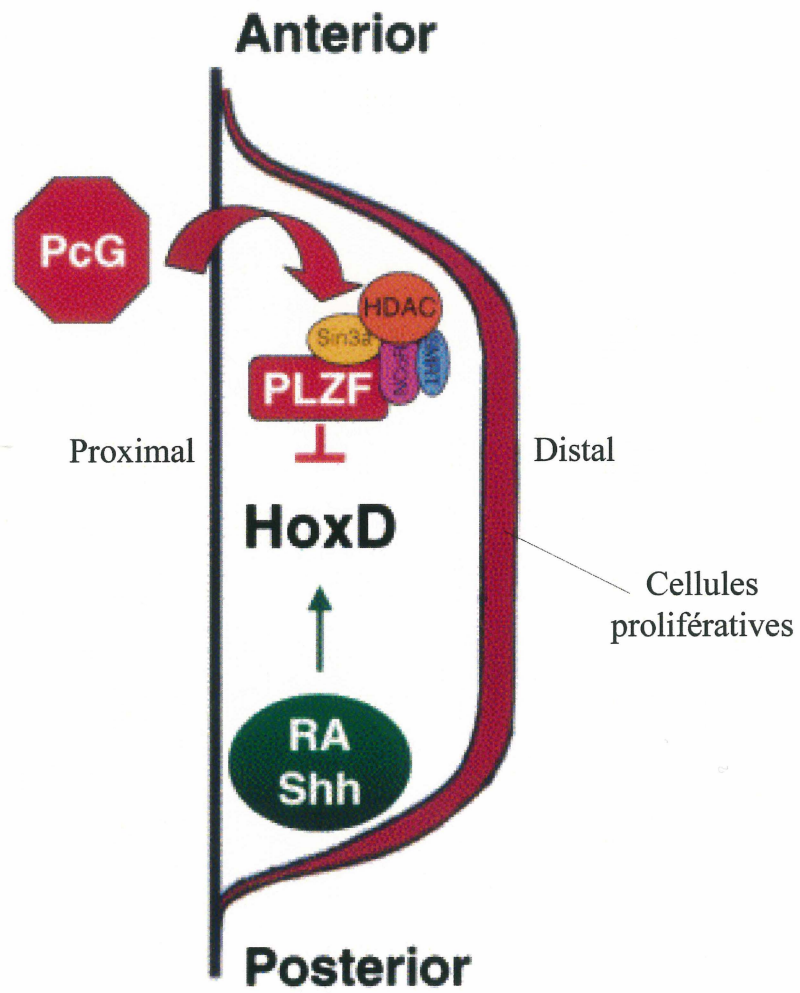
Des défauts au niveau du squelette axial sont également observés chez les souris *Plzf* mutantes. Une transformation de la morphologie des segments vertébraux en une morphologie typique de segments plus antérieurs est observée. Les souris mutantes possèdent une vertèbre thoracique supplémentaire ainsi qu'une paire supplémentaire de côtes. Il y a par contre perte de vertèbres caudales, entraînant un raccourcissement de la queue. Ces altérations morphologiques sont reliées à une altération de l'expression de gènes Hox, plus précisément Hoxc6 et Hoxc8 (Barna et al, 2000).

Plzf joue également un rôle dans le développement du système nerveux central (Cook et al, 1995 ; Avantaggiato et al, 1995). Des études chez la souris et le poulet suggèrent que PLZF aurait un rôle fonctionnel important dans la segmentation du cerveau postérieur. La fonction exacte de PLZF dans ce processus n'est pas encore élucidée, mais son patron d'expression à 10.0 d.p.c. (days post-coitum ; jours suivants l'accouplement), conservé chez les vertébrés, suggère qu'il régulerait



**Figure 7. Rôle de PLZF dans le développement des membres postérieurs.**

Les membres des vertébrés se développent initialement sous forme d'un bourgeon de cellules mésenchymateuses. Dans les membres en développement, Plzf agit comme un inhibiteur de croissance et comme un facteur pro-apoptotique dans les régions interdigitales. De plus, Plzf, qui est exprimé dans la région antérieure du bourgeon des membres arrières chez la souris, agirait également comme un régulateur négatif important des gènes Hox et Bmp. L'absence de Plzf entraîne donc une antériorisation de l'expression des gènes Hox, ce qui entraîne une postériorisation de la morphologie du membre.



potentiellement les interactions entre les cellules situées au niveau des frontières rhombomériques (Cook et al, 1995). La régulation de Hoxb2, une cible directe de PLZF, contribuerait à son rôle dans le développement du cerveau postérieur (Ivins et al, 2003). PLZF serait également impliqué dans la régionalisation du système nerveux central et dans l'organisation du cerveau antérieur (Avantaggiato et al, 1995).

#### 3.4.4 Implication du répresseur PLZF dans le maintien des cellules souches

L'hématopoïèse et la spermatogénèse sont deux processus dans lesquels la présence des cellules souches est essentielle à l'équilibre du système (Figure 8). Les différentes protéines impliquées dans le maintien de ces cellules souches sont encore très peu connues, mais il semble que le facteur de transcription PLZF y joue un rôle primordial.

##### 3.4.4.1 PLZF et l'hématopoïèse

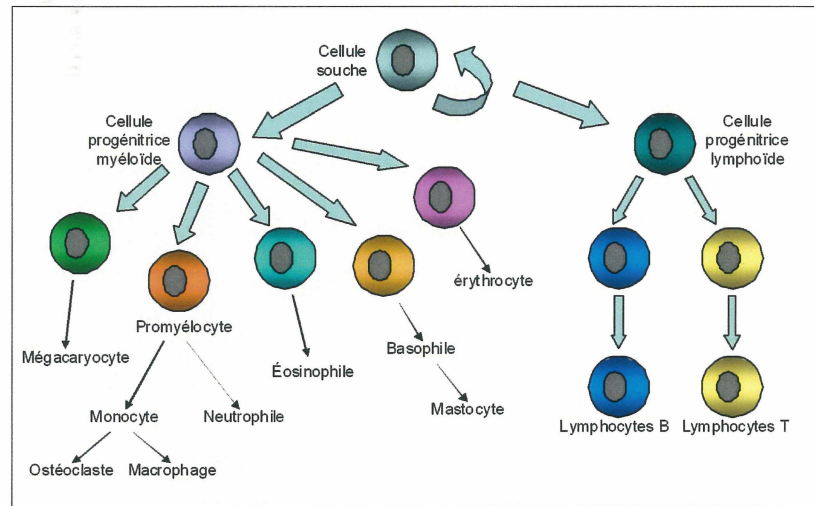
L'implication de PLZF dans le développement d'une leucémie a mené différents groupes de recherche à se questionner sur le rôle de cette protéine dans l'hématopoïèse. Dans le système hématopoïétique, l'ARNm de PLZF est exprimé de manière spécifique à la lignée et au stade de différenciation étudié (Chen et al, 1993 ; Reid et al, 1995). Plusieurs travaux effectués suggèrent que le produit du gène PLZF pourrait avoir un rôle spécifique dans les stades précoces de l'hématopoïèse, comme par exemple le maintien de l'état indifférencié des cellules progénitrices ou dans le contrôle de leur détermination. En effet, le messager de

**Figure 8. Schématisation de l'hématopoïèse et de la spermatogénèse.**

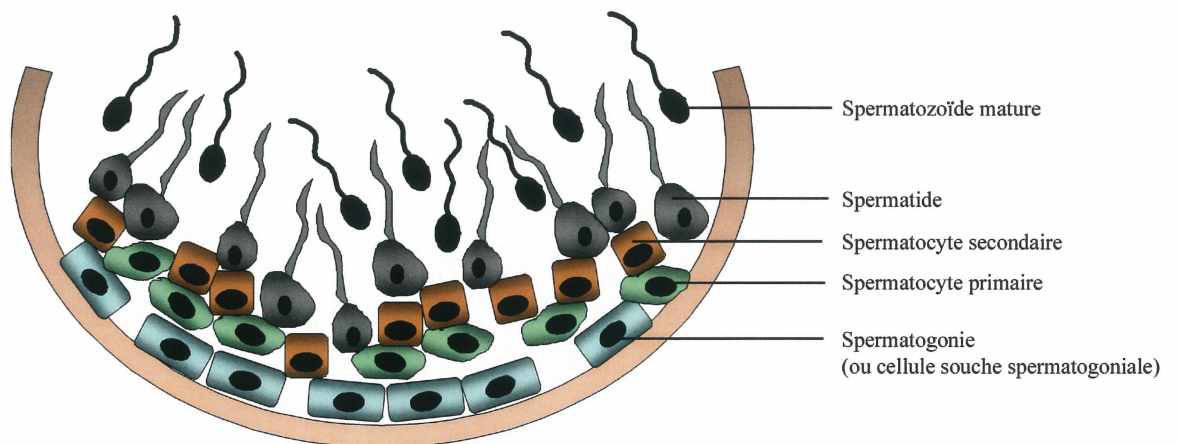
**A) L'hématopoïèse.** Les cellules souches hématopoïétiques vont se renouveler et /ou donner naissance à une cellule progénitrice myéloïde ou lymphoïde. Les cellules de la lignée myéloïde vont se différencier pour produire un des types cellulaires suivants, soit un érythrocyte, un basophile, un éosinophile, un neutrophile, un monocyte ou un mégacaryocyte, alors que les cellules de la lignée lymphoïde vont se différencier en lymphocyte B ou T.

**B) La spermatogénèse.** Le processus de la spermatogénèse est celui permettant la production de spermatozoïdes matures. Dans les tubules séminifères normaux, on retrouve contre la lame basale les spermatogonies, qui sont les cellules souches qui ont la capacité de se renouveler. Ces cellules vont donner naissance aux spermatocytes primaires. Suite à une première division méiotique, les spermatocytes primaires donneront naissance aux spermatocytes secondaires, qui subiront la deuxième division méiotique menant à la production des spermatides. Ces derniers matureront pour finalement produire les spermatozoïdes.

A



B



PLZF est exprimé à des niveaux plus élevés dans les cellules progénitrices multipotentes et indifférenciées, alors qu'une diminution progressive de son expression est observée au fur et à mesure que les cellules deviennent plus matures. Le même phénomène est noté lors de la différenciation des cellules lymphocytaires, granulocytaires et érythrocytaires (Parrado et al, 2000 ; Reid et al, 1995 ; Labbaye et al, 2002).

L'expression ectopique de PLZF dans les cellules progénitrices myéloïdes murines 32Dcl3 a permis de préciser le rôle de ce répresseur dans le système hématopoïétique. La présence de PLZF dans ces cellules est associée à une suppression significative de la croissance cellulaire et à un arrêt du cycle cellulaire en G1, probablement dus à la sécrétion d'un facteur suppresseur de croissance dans le milieu de culture (Shaknovich et al, 1998). La surexpression de ce répresseur transcriptionnel inhibe également l'induction de la différenciation en granulocytes, en macrophages ou en monocytes (Shaknovich et al, 1998 ; Ward et al, 2001). La présence de PLZF confère aussi aux cellules myéloïdes et lymphocytaires une résistance à l'apoptose induite par un stress tel que la privation en facteurs de croissance (Shaknovich et al, 1998 ; Parrado et al, 2004). Dans les cellules du compartiment lymphoïde, c'est via la répression du facteur pro-apoptotique BID (BH3 interacting domain death agonist) que PLZF médie son effet anti-apoptotique (Parrado et al, 2004). L'effet anti-apoptotique de PLZF est tel qu'une plus forte expression dans les cellules lymphocytaires malignes (B-CLL) est considérée comme un très mauvais pronostic pour le patient atteint (Parrado et al, 2000). Toutes ces observations suggèrent que, dans l'hématopoïèse de la plupart des lignées myéloïdes et lymphoïdes, PLZF aiderait au maintien de

l'état de quiescence des cellules progénitrices et renforcerait leur survie (Shaknovich et al, 1998).

#### 3.4.4.2 PLZF et la spermatogénèse

Au niveau des testicules de souris, l'expression de PLZF est spécifique aux cellules souches spermatogoniales, ce qui suggère que ce facteur de transcription pourrait jouer un rôle essentiel dans le processus de la spermatogénèse. En fait, PLZF n'est exprimé que dans les spermatogonies quiescentes (négatives pour la cycline D1 et D2), ce qui permet de déduire que cette protéine n'est pas simplement impliquée dans la prolifération de ces cellules souches (Costoya et al, 2004). L'absence de PLZF dans les deux modèles de souris mutantes cause une stérilité chez le mâle caractérisée par une perte progressive des cellules germinales, entraînant éventuellement un défaut dans la production des spermatozoïdes matures (Kotaja et Sassone-Corsi, 2004 ; Buaas et al, 2004 ; Costoya et al, 2004). En effet, les testicules de ces mâles sont beaucoup plus petits que ceux des souris sauvages, et une analyse histologique de tubules séminifères indique que l'absence de PLZF n'empêche pas le processus de spermatogénèse comme tel, puisque ces mutants produisent bien des spermatozoïdes morphologiquement normaux dans les tubules possédant toujours des cellules germinales. Des expériences de transplantation de cellules germinales indiquent également que les compartiments somatiques des souris mutantes ne sont pas altérés par l'absence de PLZF et qu'ils sont aptes à supporter la spermatogénèse. L'absence de cette protéine mène plutôt à une diminution significative du nombre de spermatogonies (cellules souches) prolifératives suite à une modification de la balance entre l'auto-renouvellement

des cellules souches et leur différenciation. PLZF joue donc un rôle essentiel dans le maintien de l'état indifférencié des cellules souches spermatogoniales (Buaas et al, 2004 ; Costoya et al, 2004).

#### **4. Problématique et objectif du projet de recherche**

Puisqu'il est un joueur essentiel dans le maintien de la balance entre l'auto-renouvellement et la différenciation des cellules souches dans différents systèmes, PLZF représente une cible de choix pour l'étude du maintien des cellules souches intestinales. Une étude effectuée dans notre laboratoire a identifié PLZF comme une cible transcriptionnelle du répresseur CDP, qui est lui-même exprimé dans l'épithélium de l'iléon et du côlon (Fréchette, 2006). Jusqu'à maintenant, aucune autre information citée dans la littérature ne relie PLZF à l'intestin.

Étant donné une certaine ressemblance entre les mécanismes de renouvellement des systèmes hématopoïétique, spermatogénique et intestinal, l'objectif de cette présente étude était de déterminer le rôle de la protéine PLZF dans le maintien de l'épithélium intestinal et colonique.



## **II- Matériel et méthodes**

### **1. Culture cellulaire**

#### **1.1 Les cellules 293T**

Les cellules 293T, qui sont des cellules transformées de rein fœtal humain, ont été cultivées dans du milieu DMEM (Gibco BRL, Burlington, Canada) supplémenté avec 10% de sérum bovin fœtal (FBS) (ICN Biomedicals, Aurora, États-Unis), 2 mM de glutamine (Gibco BRL, Burlington, Canada), 0,01 mM d'HEPES (Gibco BRL, Burlington, Canada) et 100 µg/ml de pénicilline/streptomycine (Gibco BRL, Burlington, Canada). Cette lignée cellulaire croît dans un environnement dont la température est fixée à 37°C et dont le taux de CO<sub>2</sub> est maintenu à 5%. Du milieu frais a été fourni à tous les deux jours, et les cellules ont été réensemencées à l'atteinte de la confluence, dans un ratio de 1 :10.

#### **1.2 Les cellules HIEC**

Les cellules épithéliales intestinales humaines HIEC ont été cultivées dans du milieu OptiMEM (Gibco BRL, Burlington, Canada) supplémenté avec 10% de sérum bovin fœtal (FBS) (ICN Biomedicals, Aurora, États-Unis), 2 mM de glutamine (Gibco BRL, Burlington, Canada), 0,01 mM d'HEPES (Gibco BRL, Burlington, Canada) et 100 µg/ml de pénicilline/streptomycine (Gibco BRL, Burlington, Canada). Cette lignée cellulaire croît dans un environnement dont la température est fixée à 37°C et dont le taux de CO<sub>2</sub> est maintenu à 5%. Du milieu

frais a été fourni à tous les deux jours, et les cellules ont été réensemencées à l'atteinte de la confluence, dans un ratio de 1 : 5.

### 1.3 Les cellules Caco-2/15

La lignée cellulaire Caco-2/15, un clone de la lignée parentale Caco-2 (Beaulieu et Quaroni, 1991), provient d'un adénocarcinome colorectal humain et a la particularité d'entamer un processus de différenciation épithéliale à l'atteinte de la confluence (Pinto et al, 1983). Ces cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM (Gibco BRL, Burlington, Canada) supplémenté avec 10% de sérum bovin fœtal (FBS) (ICN Biomedicals, Aurora, États-Unis), 2 mM de glutamine (Gibco BRL, Burlington, Canada), 0,01 mM d'HEPES (Gibco BRL, Burlington, Canada) et 100 µg/ml de pénicilline/streptomycine (Gibco BRL, Burlington, Canada). Cette lignée cellulaire croît dans un environnement dont la température est fixée à 37°C et dont le taux de CO<sub>2</sub> est maintenu à 5%. Du milieu frais a été fourni à tous les deux jours, et les cellules ont été réensemencées avant l'atteinte de la confluence, dans un ratio de 1 :10.

### 1.4 Les cellules T84

Les cellules T84 proviennent d'un carcinome colorectal humain et ont été cultivées dans du milieu HAM'S : DMEM (1 :1) (Gibco BRL, Burlington, Canada) supplémenté avec 10% de sérum bovin fœtal (FBS) (ICN Biomedicals, Aurora, OH), 2 mM de glutamine (Gibco BRL, Burlington, Canada), 0,01 mM d'HEPES (Gibco BRL, Burlington, Canada) et 100 µg/ml de

penicilline/streptomycine (Gibco BRL, Burlington, Canada). Cette lignée cellulaire croît dans un environnement dont la température est fixée à 37°C et dont le taux de CO<sub>2</sub> est maintenu à 5%. Du milieu frais a été fourni à tous les deux jours, et les cellules ont été réensemencées à l'atteinte de la confluence, dans un ratio de 1 :10.

### 1.5 Les cellules DLD-1

La lignée cellulaire DLD-1, isolée à partir d'un adénome colorectal humain, a été cultivée dans du milieu RPMI 1640 (Gibco BRL, Burlington, Canada) supplémenté avec 10% de sérum bovin fœtal (FBS) (ICN Biomedicals, Aurora, États-Unis) inactivé suite à une incubation de 30 minutes à 55°C, 2 mM de glutamine (Gibco BRL, Burlington, Canada), 0,01 mM d'HEPES (Gibco BRL, Burlington, Canada) et 100 µg/ml de penicilline/streptomycine (Gibco BRL, Burlington, Canada). Cette lignée cellulaire croît dans un environnement dont la température est fixée à 37°C et dont le taux de CO<sub>2</sub> est maintenu à 5%. Du milieu frais a été fourni à tous les deux jours, et les cellules ont été réensemencées à l'atteinte de la confluence, dans un ratio de 1 :10.

### 1.6 Les cellules Colo205

Les cellules Colo205, isolées à partir d'un adénocarcinome colorectal humain, ont été cultivées dans du milieu DMEM (Gibco BRL, Burlington, Canada) supplémenté avec 10% de sérum bovin fœtal (FBS) (ICN Biomedicals, Aurora, États-Unis), 2 mM de glutamine (Gibco BRL, Burlington, Canada), 0,01 mM d'HEPES (Gibco BRL, Burlington, Canada) et 100 µg/ml de

penicilline/streptomycine (Gibco BRL, Burlington, Canada). Cette lignée cellulaire croît dans un environnement dont la température est fixée à 37°C et dont le taux de CO<sub>2</sub> est maintenu à 5%. Du milieu frais a été fourni à tous les deux jours, et les cellules ont été réensemencées à l'atteinte de la confluence, dans un ratio de 1 :10.

### 1.7 Les cellules HCT-116

La lignée cellulaire HCT-116 provient d'un carcinome colorectal humain. Elle a été cultivée dans du milieu McCoy's (Gibco BRL, Burlington, Canada) supplémenté avec 10% de sérum bovin fœtal (FBS) (ICN Biomedicals, Aurora, États-Unis), 2 mM de glutamine (Gibco BRL, Burlington, Canada), 0,01 mM d'HEPES (Gibco BRL, Burlington, Canada) et 100 µg/ml de penicilline/streptomycine (Gibco BRL, Burlington, Canada). Cette lignée cellulaire croît dans un environnement dont la température est fixée à 37°C et dont le taux de CO<sub>2</sub> est maintenu à 5%. Du milieu frais a été fourni à tous les deux jours, et les cellules ont été réensemencées à l'atteinte de la confluence, dans un ratio de 1 :10.

## 2. Extractions protéiques

### 2.1 Extraction des protéines totales

#### 2.1.1 Extraction à partir de cellules en culture

Lorsque les cellules ont atteint la confluence désirée, elles ont été rincées deux fois avec du PBS 1X (137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 2

mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) et récoltées à l'aide d'un grattoir dans du tampon de lyse composé de 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% NP40 et 0,5% sodium-déoxycolate, auquel ont été ajouté 1% de cocktail d'inhibiteur de protéases (*protease inhibitor for mammalian tissues*) (Sigma Aldrich, Oakville, Canada), 200 mM d'orthovanadate et 50 mM NaF, juste avant l'extraction. Les récoltes cellulaires ont été incubées 10 minutes sur glace, avant d'être centrifugées à vitesse maximale pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant (contenant les protéines) a ensuite été prélevé et conservé à -80°C jusqu'à l'utilisation. Les protéines extraites selon cette méthode ont été dosées grâce à la technique de Bradford (BioRad, Mississauga, Canada) et la densité optique a été mesurée avec un spectrophotomètre (BioRad, Mississauga, Canada) à 595 nm.

#### 2.1.2 Extraction à partir de tissu fœtal humain

Les spécimens provenant de fœtus humains ont été récupérés à la suite d'interruptions légales de grossesses réalisées au Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke, et cette procédure était en conformité avec les protocoles établis et approuvés par le comité d'éthique de l'Université de Sherbrooke.

Le côlon provenant d'un fœtus de 19 semaines a été prélevé et lavé dans du PBS 1X. Afin d'exposer l'épithélium intestinal, le segment a été coupé longitudinalement, et ensuite en petits morceaux d'environ 5 mm de longueur. Les fragments ont ensuite été transférés dans un tube 15 mL de type falcon contenant 5 mL de solution de matrisperse (*Cell Recovery Solution*, BD Biosciences, Mississauga, Canada). Le tube a ensuite été placé à l'horizontal pour favoriser le

contact entre les morceaux de côlon et la solution, à 4°C pendant 10 heures. Suite à cette incubation, du PBS 1X a été ajouté afin d'obtenir un volume total de 10 mL. Le tube a ensuite été agité vigoureusement et la suspension de cellules épithéliales a été récoltée en faisant attention de ne pas transférer avec elle les morceaux de tissus résiduels. Le détachement des cellules épithéliales grâce à l'agitation des fragments de côlon dans le PBS 1X a été effectué de façon répétée, jusqu'à ce que les cellules épithéliales ne se détachent plus (donc jusqu'à ce que la solution ne devienne plus trouble). La récolte des protéines totales a par la suite été effectuée telle que décrite dans la section 2.1.1.

## 2.2 Extraction des protéines suite au fractionnement des compartiments cellulaires

### 2.2.1 Extraction à partir de cellules

Le fractionnement des cellules en culture a été effectué à l'aide de la trousse « *ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit* » (S-PEK) (Calbiochem, Darmstadt, Allemagne), selon les recommandations du fournisseur. Ce type de fractionnement permet la récolte de quatre fractions distinctes : le cytosol (fraction I), les membranes et les organelles (fraction II), le noyau (fraction III) et le cytosquelette (fraction IV). Les cellules trypsinisées et centrifugées furent d'abord lavées deux fois avec le tampon de lavage (*Wash Buffer*). Le tampon d'extraction I (*Extraction Buffer I*) contenant un cocktail d'inhibiteur de protéase a ensuite été ajouté aux cellules et le tout a été incubé 10 minutes à 4°C, avec une agitation douce. Les cellules ont ensuite été culottées par centrifugation pendant 10 minutes à 750 g et le surnageant contenant les protéines de la fraction I fut récolté. Le culot

a alors été resuspendu dans le tampon d'extraction II (*Extraction Buffer II*) contenant le cocktail d'inhibiteur de protéase. Le tout fut incubé 30 minutes à 4°C sur un agitateur rotatif. Les cellules ont par la suite été culottées à 4°C par centrifugation à 5 500 g pendant 10 minutes. Le surnageant contenant les protéines de la fraction II fut récolté et le culot resuspendu dans le tampon d'extraction III (*Extraction Buffer III*) contenant, en plus du cocktail d'inhibiteur de protéase, de la nucléase benzonase. La suspension fut une nouvelle fois incubée sur un agitateur rotatif pendant 10 minutes à 4°C. Le matériel cellulaire résiduel fut culotté à 4°C grâce à une centrifugation à 6 800 g pendant 10 minutes. Le surnageant contenant les protéines de la fraction III a été transféré dans un autre tube, et le culot fut doucement resuspendu dans le tampon d'extraction IV (*Extraction Buffer IV*) contenant le cocktail d'inhibiteur de protéase, cette suspension contenant les protéines de la fraction IV.

L'estimation de la concentration protéique dans ces fractions fut effectuée avec la trousse « *Non Interfering Protein Assay* » (Calbiochem, Darmstadt, Allemagne), selon les recommandations du fournisseur.

#### 2.2.2 Extraction à partir de cellules épithéliales isolées chez la souris selon la technique de Weiser

Cette méthode fut inspirée de la technique de Weiser et a été adaptée dans le laboratoire du Dr. Daniel Ménard (Ménard et al, 1987). Suite au sacrifice de souris normales de souche CD1 (Charles Rivers Laboratories, Wilmington, États-Unis), l'intestin grêle et le côlon ont été prélevés séparément et inversés sur un tube de

polyéthylène Tubing PE 240 (BD Biosciences, Mississauga, Canada). Des sections d'environ 4 cm ont été coupées et les extrémités ont été ligaturées avec du fil à coudre. Les morceaux d'intestin ont ensuite été lavés deux fois avec du tampon KRP à pH 7,5 (5 mM KCl, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 118 mM NaCl, et 100 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Afin de dissocier les cellules épithéliales, les segments intestinaux ont été déposés dans des erlenmeyers de 50 ml, en présence de 10 mL de solution EDTA pH 7,5 (2,5 mM EDTA, 0,25 M NaCl, et 0,5 mM DTT). Des périodes d'une minute d'agitations vigoureuses suivie de périodes d'une minute de repos sur glace ont été effectuées en alternance, pour un total de 5 minutes. La suspension cellulaire obtenue a ensuite été récoltée dans un tube de 15 mL de type falcon et conservée sur glace jusqu'à l'extraction protéique. Les étapes de dissociation cellulaire ont été répétées jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de cellules épithéliales qui se détachent. Les tubes contenant les différentes fractions ont finalement été centrifugés à 1000 rpm, pendant 5 minutes à 4°C. L'ensemble des cellules de certaines fractions intactes fut utilisé pour les manipulations suivantes. Les protéines des différents compartiments cellulaires ont été extraites avec le kit S-PEK (Calbiochem, Darmstadt, Allemagne), de la manière décrite dans la section 2.2.1, et une analyse par immunobuvardage de type Western fut effectuée, telle que décrite dans la section 9.



### 3. Extraction de l'ARN total

#### 3.1 Extraction à partir de cellules en culture

L'ARN a été extrait selon le protocole fourni avec la trousse « *Totally RNA extract* » (Ambion, Austin, États-Unis), et les manipulations ont été effectuées sur glace en utilisant des embouts filtrés. Les cellules ont d'abord été lavées avec du PBS 1X. Suite au retrait du PBS, 500 µl de solution dénaturante ont été ajoutés et les cellules furent récupérées à l'aide d'un grattoir stérile. La suspension cellulaire a été transférée dans un tube eppendorf et des pipetages répétés ont été effectués afin de bien resuspendre les cellules dans la solution dénaturante. Un volume de phénol/chloroforme a ensuite été ajouté et le tout fut vortexé jusqu'à ce que la solution soit homogène. Après une incubation de 5 minutes sur glace, le mélange a été centrifugé 5 minutes à 12 000 g. La phase aqueuse (en surface) a été transférée dans un nouvel eppendorf. Un dixième de volume d'acétate de sodium a ensuite été ajouté à la solution et le tout a été mélangé par inversion durant une période d'environ 10 secondes. Un volume équivalent de phénol/chloroforme acide a été ajouté au mélange et ce dernier a été vortexé vigoureusement. Suite à une incubation de 5 minutes sur glace, la solution a été centrifugée 5 minutes à 12 000 g. La phase aqueuse fut à nouveau transférée dans un nouveau tube eppendorf et un volume d'isopropanol fut ajouté. Le mélange fut vortexé et placé pendant 30 minutes à -20°C pour la précipitation de l'ARN. Le mélange fut ensuite centrifugé pendant 15 minutes à 12 000 g. Le surnageant a été retiré et le culot fut resuspendu dans 100 µl d'eau DEPC. Un demi volume de chlorure de lithium a ensuite été ajouté et le mélange vortexé fut incubé à -20°C pendant 30 minutes. Une

centrifugation à 12 000 g pendant 15 minutes s'en est suivie. Le culot d'ARN a été lavé avec 300 µl d'éthanol 70 % froid. Le culot a été séché à l'air ambiant et ensuite resuspendu dans de l'eau DEPC. L'ARN a finalement été chauffé pendant 3 minutes à 70°C et resuspendu par pipettages répétés. Un traitement à la DNase a permis d'éliminer toutes traces d'ADN. Du tampon DNase 10X (Roche, Laval, Canada) et une unité de l'enzyme DNase (Roche, Laval, Canada) ont été ajoutés et la réaction a incubée à 37°C pendant 30 minutes. Finalement, l'enzyme fut inactivée par l'ajout de 5 mM d'EDTA et par une incubation à 75°C pendant 10 minutes. Le dosage de l'ARN a été effectué à l'aide d'un spectrophotomètre (BioRad, Mississauga, Canada).

### 3.2 Extraction à partir de tissu fœtal humain (estomac total et cellules épithéliales du côlon)

L'estomac fœtal humain a d'abord été homogénéisé dans la solution dénaturante (Ambion, Austin, États-Unis) à l'aide d'un polytron (Brinkmann instruments, Westbury, États-Unis). Le côlon fœtal humain a subi un traitement avec la solution matrisperse (BD Biosciences, Mississauga, Canada). Les cellules épithéliales coloniques recueillies ont été ensuite resuspendues dans la solution dénaturante. Pour les deux types de tissu, l'ARN a été extrait selon le protocole fourni avec la trousse « *Totally RNA extract* » (Ambion, Austin, États-Unis), tel que décrit à la section 3.1.

#### 4. Réactions de transcription inverse et de polymérisation en chaîne (RT-PCR)

De l'ADNc a été produit à partir d'ARN en utilisant la transcriptase inverse (RT) (Roche, Laval, Canada). Pour ce faire, 1 µg d'ARN a été mélangé avec de l'eau DEPC afin d'obtenir un volume total de 10 µl. Les structures secondaires des ARNm ont été dénaturées grâce à une incubation de 5 minutes à 75°C. L'ARN a ensuite été rapidement déposé sur glace, et y est demeuré pendant 5 minutes. 0,3 µl d'eau DEPC (Ambion, Austin, États-Unis), 4,0 µl de tampon AMV-RT 5X (Roche, Laval, Canada), 0,8 µl de dNTPs 25 mM (Amersham Biosciences, Laval, Canada), 2,4 µl d'oligo dT (Amersham Biosciences, Laval, Canada), 1 µl d'inhibiteur de RNase (Roche, Laval, Canada) et 1,5 µl d'enzyme transcriptase inverse (Roche, Laval, Canada) ont été ajoutés à l'ARN. La réaction fut effectuée pendant une heure à 42°C et la RT fut inactivée lors d'un chauffage à 95°C pendant 5 minutes. L'ADNc ainsi produit fut conservé à -20°C.

Les ADNc synthétisés ont ensuite subi une réaction d'amplification par PCR. Pour chaque réaction, un mélange contenant 5 µl de tampon d'amplification 10X (Eppendorf, Mississauga, Canada), 0,8 µl de dNTPs 25 mM, 100 ng de chacun des oligonucléotides (Tableau 1A), de l'eau bidistillée stérile (pour compléter le volume final à 50 µl), et 0,3 µl d'enzyme « *HotMaster Taq Polymerase* » (Eppendorf, Mississauga, Canada), ont été ajoutés à 1 µl d'ADNc.

**Tableau 1 : Amorces utilisées pour l'amplification par PCR**

Région amplifiée	Amorces utilisées
A) Séquence codante PLZF humain	en 5' : <i>hPLZF1g</i> 5'-CGTGATACGGAGAGCAACAG-3'  en 3' : <i>hPLZF2g</i> 5'-CCCTTCACACATAGCACAGG-3'
B) Séquence codante PLZF humain, avec mutation du 1 <sup>er</sup> ATG en ATA	en 5' : <i>hPLZF1ATA</i> 5'GCCGAGGGGAGCACCATAGATCTGACAAAA ATGGGC-3'  en 3' : <i>hPLZF2g</i> 5'-CCCTTCACACATAGCACAGG-3'

L'amplification de la séquence codante de PLZF a été effectuée selon le protocole suivant :

**Tableau 2 : Cycles d'amplification par PCR**

# Cycle	Nombre de répétition	# Étape	Température	Durée
1	1X	1	94°C	2 minutes
2	40X	1	94°C	20 secondes
		2	55°C	20 secondes
		3	70°C	2 minutes
3	1X	1	70°C	10 minutes
4	1X	1	4°C	infini

Cette réaction de PCR a permis l'amplification des différentes formes épissées de l'ARNm de PLZF dans les différentes lignées et les différents tissus étudiés.

## 5. Traitement de cellules avec différents inhibiteurs de protéases

Des traitements avec différents inhibiteurs de protéases ont été infligés aux lignées cellulaires cancéreuses colorectales Caco-2/15, Colo205 et T84, tel que résumé au tableau 3. La durée des traitements fut de 18 heures. Afin d'éliminer les effets possibles des solvants sur les cellules, des puits contrôles ont été traitées en parallèle avec les solvants des inhibiteurs.

**Tableau 3 : Traitement de différentes lignées cellulaires avec des inhibiteurs de protéases**

Inhibiteur utilisé (et son solvant)	Fournisseur	Lignée cellulaire	Concentration du traitement
MG132 (DMSO)	Sigma Aldrich, Oakville, Canada	Caco-2/15	50 $\mu$ M
		Colo205	25 $\mu$ M
		T84	25 $\mu$ M
Calpeptin (DMSO)	EMD Biosciences, San Diego, États-Unis	Caco-2/15	50 $\mu$ M
		Colo205	50 $\mu$ M
		T84	50 $\mu$ M
EST (Ethanol)	EMD Biosciences, San Diego, États-Unis	Caco-2/15	50 $\mu$ M
		Colo205	25 $\mu$ M
		T84	50 $\mu$ M
EDTA (Eau)	Fisher, Nepean, Canada	Caco-2/15	0,5 mM
		Colo205	0,5 mM
		T84	0,5 mM

Les protéines totales ont finalement été extraites de la manière décrite dans la section 2.1.1.

## 6. Préparation des différentes constructions plasmidiques

### 6.1 Clonage de PLZF dans le vecteur pBabe puro

L'insert PLZF a d'abord été obtenu à partir d'une digestion EcoRI (Roche, Laval, Canada) du vecteur pSG5/PLZF, gracieusement fourni par le Dr. Pier Paolo Pandolfi (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Sloan-Kettering Institute, New-York). Le fragment correspondant à PLZF fut récupéré par électroélution. Le produit de digestion a été migré sur un gel d'agarose, la bande correspondant à PLZF excisée et ensuite placée dans un sac à dialyse en présence de tampon TAE 1X (40 mM Tris-acétate, 1 mM EDTA) et soumise à un courant de 80V dans une cuve de migration, jusqu'à ce que l'ADN soit complètement sorti du gel. Le liquide a été récupéré et un volume de phénol/chloroforme y a été ajouté afin de se débarrasser de l'enzyme et des résidus d'agarose. Suite à une centrifugation à 14 000 rpm pendant 10 minutes, le surnageant fut récolté. 10% de volume d'acétate de sodium 3M pH 5,2 fut ajouté et le mélange fut supplémenté de 2 volumes d'éthanol froid. Le mélange fut vortexé et l'ADN précipité à -80°C pendant au moins 30 minutes. Une centrifugation a été effectuée à 13 000 rpm pendant 15 minutes afin de culotter l'ADN, qui a ensuite été lavé deux fois avec de l'éthanol 70%. Le surplus d'éthanol a été enlevé, le culot séché à 37°C pendant quelques minutes et finalement resuspendu dans de l'eau bidistillée stérile.

Le vecteur pBabe puro fut linéarisé grâce à une digestion avec l'enzyme EcoRI, et a été soumis à une purification au phénol/chloroforme et à une précipitation à l'acétate de sodium. La ligation de PLZF dans pBabe puro a été

effectuée avec la T4 DNA ligase (New England Biolabs, Pickering, Canada) et a été transformée dans les bactéries électrocompétentes Stbl3. L'ADN a été extrait à l'aide de la trousse « *QIAprep Spin Miniprep kit* » (Qiagen, Mississauga, Canada). Les clones contenant l'insert ont été identifiés grâce à une digestion BstXI (Roche, Laval, Canada) et le sens de l'insert a été déterminé grâce à deux digestions simultanées avec les enzymes BamHI et SphI (Roche, Laval, Canada).

## 6.2 Clonage de PLZFΔ1<sup>er</sup>ATG dans pBabe puro

L'ADN de la construction pSG5/PLZF a été digéré 2 heures à 37°C avec l'enzyme de restriction EcoRI afin d'en retirer l'insert PLZF. Le fragment correspondant à PLZF a été récupéré par électroélution, suivie d'une purification au phénol/chloroforme et d'une précipitation à l'acétate de sodium. PLZF fut ensuite digéré avec l'enzyme BfrB1 (New England Biolabs, Pickering, Canada) pendant 2 heures à 37°C afin de se débarrasser du premier ATG, sans toutefois éliminer le second (tel que montré à la Figure 13A). Une électroélution, une purification au phénol/chloroforme et une précipitation à l'acétate de sodium ont à nouveau été effectuées.

Le vecteur rétroviral pBabe puro fut par la suite digéré par l'enzyme EcoRI, 2 heures à 37°C, pour ensuite subir une purification au phénol/chloroforme et une précipitation à l'acétate de sodium. Une seconde digestion avec l'enzyme de restriction SnaBI (New England Biolabs, Pickering, Canada) a été effectuée pendant 2 heures à 37°C, et a été suivie d'une électroélution, d'une purification au phénol/chloroforme et d'une précipitation à l'acétate de sodium. PLZFΔ1<sup>er</sup>ATG a

été ligué dans pBabe puro grâce à la T4 DNA ligase. La ligation a été transformée dans les bactéries électrocompétentes Stbl3 et l'ADN isolé avec la trousse « *QIAprep Spin Miniprep kit* ». Les clones positifs ont été identifiés grâce à une digestion avec l'enzyme BstXI.

### 6.3 Clonage de PLZF1<sup>er</sup>ATG →ATA dans TOPO

Une amplification par PCR a été effectuée afin de muter le 1<sup>er</sup> site d'initiation de la traduction de la séquence codant pour PLZF. 50 ng de l'ADN pSG5/PLZF dans lesquels ont été ajouté 5 µl de tampon pour Pfu Ultra 10X, 0,8 µl de dNTPs 25 mM, 100 ng de chacun des oligonucléotides (Tableau 1B), de l'eau bidistillée stérile (pour compléter le volume final à 50 µl) et 0,5 µl de l'enzyme polymérase Pfu Ultra (Stratagene, La Jolla, États-Unis), ont été utilisés pour la réaction. Le protocole d'amplification est décrit au tableau 4.

**Tableau 4: Cycles d'amplification par PCR**

# Cycle	Nombre de répétition	# Étape	Température	Durée
1	1X	1	95°C	2 minutes
2	40X	1	95°C	30 secondes
		2	55°C	30 secondes
		3	72°C	2 min 30 sec
3	1X	1	72°C	10 minutes
4	1X	1	4°C	infini

Le produit de PCR a ensuite été inséré dans le vecteur pCR Blunt II TOPO à l'aide du « *Zero Blunt TOPO PCR Cloning kit* » (Invitrogen, Burlington, Canada). 4 µl du produit de PCR a été mélangé à 1 µl de solution de sel et 1 µl de vecteur TOPO.



Ce mélange a été incubé 30 minutes à la température de la pièce avant d'être placé sur glace. 2 µl de la réaction de clonage ont ensuite été déposés dans un tube contenant des bactéries compétentes TOP10 et le tout fut incubé sur glace pendant 30 minutes. Les bactéries ont ensuite été soumises à un choc thermique produit grâce à leur transfert immédiat sur glace suite à une incubation de 30 secondes à 42°C. 250 µl de milieu SOC (Invitrogen, Burlington, Canada) ont finalement été ajoutés, les bactéries incubées environ 1 heure sur un agitateur à 37°C et ensemencées sur un pétri LB supplémenté avec de la kanamycine (Fisher Biotech, Western Australia, Australie). L'ADN fut isolé à l'aide de la trousse « *QIAprep Spin Miniprep kit* ». Les clones positifs ont été identifiés grâce à deux digestions indépendantes avec les enzymes EcoRI et SacI (Roche, Laval, Canada). La présence de la mutation a été confirmée par séquençage par le DNA Core de l'Université de Calgary.

## **7. Transfection transitoire d'ADN dans les cellules en culture**

Les transfections des différents ADNs (pBabe puro/PLZF, pBabe puro/PLZFΔ1<sup>er</sup>ATG, pSG5/PLZF-Flag) ont été effectuées en utilisant la lipofectamine 2000 (Invitrogen, Burlington, Canada) comme agent de transfection. La veille de la transfection, les cellules ont été ensemencées de façon à ce qu'elles soient à une confluence d'environ 90% le jour de la transfection. Le jour de la transfection, 24 µg total d'ADN ont été mélangés à 1,5 mL de milieu OptiMEM (Gibco BRL, Burlington, Canada) et 60 µl de lipofectamine 2000 ont été ajoutés à 1,5 mL de ce même milieu. Le mélange fut incubé 5 minutes à la température de la pièce avant d'être ajouté au mélange ADN/OptiMEM et incubé à nouveau 20

minutes. Le milieu des cellules a ensuite été remplacé par le mélange ADN/Lipofactamine2000/OptiMEM et le volume fut complété à 15 mL. Le pétri a ensuite été déposé dans l'incubateur à 37°C/5% CO<sub>2</sub> pendant une période de 4 heures. Finalement, le mélange ADN/Lipofactamine2000/OptiMEM a été retiré du pétri pour être remplacé par 8 mL de milieu de culture approprié au type de cellules transfectées. 48 heures après la transfection, les protéines totales ont été extraites tel que décrit à la section 2.1.1.

## 8. Immunoprécipitations

Des transfections de l'ADN pSG5/PLZF-*Flag* dans les cellules 293T ont préalablement été effectuées, selon la méthode décrite dans la section 7. 48 heures après la transfection, les cellules ont été lavées trois fois avec du PBS 1X. Elles ont ensuite été lysées avec du tampon de lyse A (150 mM NaCl, 40 mM Tris-Cl pH 7,6, 10% glycérol, et 0,3% NP40) dans lequel ont été ajoutés 1% de cocktail d'inhibiteur de protéases (*protease inhibitor for mammalian tissues*) (Sigma Aldrich, Oakville, Canada), 200 mM d'orthovanadate et 50 mM NaF. Les cellules ont ensuite été récoltées et les protéines ont été extraites tel que décrit à la section 2.1.1. 1% de l'extrait protéique a été conservé pour servir de contrôle (*Input*) pour l'immunobuvardage de type Western.

Suite à l'extraction protéique, 35 µl de billes de protéinesG-Sépharose (Amersham Biosciences, Québec, Canada) ont été lavés trois fois dans 500 µl de tampon de lyse A. Il est à noter que les billes n'ont jamais été centrifugées à plus de 3000 rpm et que toutes les manipulations ont été effectuées sur glace. Au

dernier lavage, le surnageant fut conservé et 500 µl d'extraits cellulaires y ont été ajoutés en présence de 1 µg d'anticorps PLZF (Calbiochem, Darmstadt, Allemagne) ou *Flag* (Stratagene, La Jolla, États-Unis). Le mélange fut incubé 3 heures sur un agitateur rotatif placé à 4°C. Les billes transportant les complexes formés entre les anticorps et les protéines ont ensuite été centrifugés à 3000 rpm pendant 5 minutes et lavées trois fois avec le tampon de lyse A. Les complexes ont été resuspendus dans le tampon Novex 4X (Invitrogen, Burlington, Canada), l'agent réducteur (*sample reducing agent*) (Invitrogen, Burlington, Canada) et l'eau, dans les mêmes proportions que celles utilisées pour la préparation des échantillons lors d'un immunobuvardage de type Western (section 9.1). Les complexes ont ensuite été dissociés des billes suite à un chauffage de 10 minutes à 95°C. Les billes ont alors été culottées par centrifugation, et les protéines du surnageant récoltées. 5 µl de l'immunoprécipitation ont été utilisés pour un immunobuvardage de type Western.

## **9. Immunobuvardage de type Western**

Des gels précoulés NuPage 4-12% (Invitrogen, Burlington, Canada) ont été utilisés pour la migration et la détection des différents extraits protéiques.

### **9.1 La migration et le transfert**

Une quantité fixe de protéines a été mélangée à de l'eau afin d'obtenir un volume constant de 13 µl. 5 µl de tampon Novex 4X (Invitrogen, Burlington, Canada) et 2 µl de tampon réducteur (*sample reducing agent*) (Invitrogen,

Burlington, Canada) ont été ajoutés à chacun des échantillons. Le mélange fut chauffé à 70°C pendant 10 minutes. La migration a été effectuée à 200 volts pendant au moins une heure dans le tampon de migration MOPS pH 7,7 (50 mM MOPS, 50 mM Tris base, 0,1% SDS et 1 mM EDTA). Un contrôle de poids moléculaire (*Rainbow Marker RPN 756*) (Amersham Biosciences, Québec, Canada) a été utilisé afin de déterminer la taille des protéines détectées. Suite à la migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose de type PVDF (Roche Diagnostics GmbH, Laval, Canada), activée préalablement dans du méthanol. Le transfert a été effectué à 30 volts pendant une heure, dans le tampon de transfert (25 mM Bicine, 25 mM Bis-Tris, et 1 mM EDTA) contenant de l'antioxydant (Invitrogen, Burlington, Canada). À la fin du transfert, la membrane a été rincée à l'eau bidistillée.

## 9.2 La détection des antigènes

Suite au transfert des protéines sur la membrane, les sites antigéniques ont été bloqués pendant une heure à la température de la pièce avec l'agent bloquant approprié. La membrane a ensuite été incubée en présence de l'anticorps primaire dilué dans le même agent bloquant, toute la nuit à 4°C. Deux lavages de 15 minutes avec du PBS 1X-Tween 0,1% ont suivi. Une incubation de 45 minutes à la température de la pièce, en présence de l'anticorps secondaire approprié, dilué dans l'agent bloquant, a ensuite été effectuée (Tableau 5). La membrane fut lavée trois fois dans le PBS 1X-Tween 0,1% pendant 15 minutes. Les antigènes ont finalement été détectés grâce au mélange réactionnel de la trousse ECL+ (Amersham Biosciences, Québec, Canada). La membrane a été exposée sur un

film autoradiographique (Amersham Biosciences, Québec, Canada) révélé dans une chambre noire.

**Tableau 5 : Conditions pour la détection de différents antigènes**

Protéine ou antigène à détecter	Anticorps primaire	Dilution Ac I	Type de blocage	Anticorps secondaire	Dilution Ac II
PLZF (Calbiochem)	Anti-PLZF 2A9	1 :250	Sérum lapin 0,5%	Anti-mouse	1 :3000
Actine (Santa Cruz)	Anti-Actin C-11	1 :1000	Blotto 10%	Anti-goat	1 :3000
Histone H1 (Santa Cruz)	Anti-Histone H1 Fl-219	1 :1000	Blotto 10%	Anti-rabbit	1 :3000
Cytokératine18 (Santa Cruz)	Anti-cytokeratin18 H80	1 :1000	Blotto 10%	Anti-rabbit	1 :3000
$\alpha$ -tubuline (Sigma Aldrich)	Anti- $\alpha$ -tubulin DM1A	1 :1000	Blotto 10%	Anti-mouse	1 :3000

#### 10. Essai de transcription/traduction *in vitro* avec des réticulocytes de lapin

L'essai de transcription/traduction *in vitro* avec des réticulocytes de lapin a été effectué en utilisant la trousse « *TNT Coupled Reticulocyte Lysate System* » (Promega, Madison, États-Unis). Un mélange contenant 25  $\mu$ l de lysat de réticulocyte de lapin (*TNT Rabbit Reticulocyte Lysate*), 2  $\mu$ l de tampon de réaction (*TNT reaction buffer*), 1  $\mu$ l d'ARN polymérase T7, 1  $\mu$ l d'un mélange d'acides aminés sans méthionine, 2  $\mu$ l de méthionine marquée au  $^{35}\text{S}$  (Perkin Elmer, Waltham, États-Unis), 1  $\mu$ l d'inhibiteur de ribonucléase (Roche, Laval, Canada) et 15  $\mu$ l d'eau a été effectué. 1  $\mu$ g de chacun des ADNs cités dans le

tableau 6 ont été ajoutés, chacun dans une réaction différente. Le mélange a été incubé 90 minutes à 30°C. 5 µl de chacune des réactions ont été migrés sur un gel NuPage 4-12% tel que décrit dans la section 9.1.1. Le gel a ensuite été séché à 80°C pendant une heure, pour finalement être exposé sur un écran de phosphore (BioRad, Mississauga, Canada) toute la nuit. L'écran a été révélé à l'aide de l'appareil *Molecular Imager FX* (BioRad, Mississauga, Canada). La radioactivité du gel a également été exposée sur un film d'autoradiographie (Amersham Biosciences, Québec, Canada) et révélée dans une chambre noire.

**Tableau 6: ADNs utilisés pour la transcription/traduction in vitro**

ADNs utilisés	ARN polymérase	Poids moléculaire attendu
pLenti U6 vide (Contrôle négatif)	T7	-
pSG5/PLZF (Contrôle forme complète)	T7	81 kDa
TOPO/ PLZF1 <sup>er</sup> ATG → ATA	T7	65 kDa

## **11. Localisation des protéines PLZF et cytokératine 18 par immunofluorescence**

La veille de l'expérience, les cellules de différentes lignées cancéreuses colorectales humaines (Caco-2/15, T84, Colo205, DLD-1) ont étéensemencées dans des puits d'une chambre de culture multipuits de type *Labtek* (Nalge Nunc International, Rochester, États-Unis).

Les cellules ont d'abord été rincées délicatement dans du PBS 1X. Elles ont ensuite été fixées grâce à une incubation de 10 minutes sur glace, dans du méthanol. Les cellules ont à nouveau été rincées dans le PBS 1X, pour ensuite être perméabilisées dans du triton 0,1%/PBS 1X et ce, 15 minutes à la température de la pièce. Après un rinçage dans le PBS 1X, les sites antigéniques ont été bloqués 20 minutes à la température de la pièce avec du blotto 10% (lait *carnation* dilué dans du PBS/Tween 0,1%), qui a été préalablement centrifugé quelques minutes avant son utilisation. La lame fut ensuite incubée en présence de l'anticorps primaire anti-PLZF et anti-cytokératine 18 dilués dans le blotto 10%, 90 minutes à la température de la pièce. Il est à noter qu'un puits fut incubé sans anticorps primaire comme contrôle négatif pour chacun des anticorps secondaires. Les cellules ont ensuite été rincées dans le PBS 1X et incubées 30 minutes en présence de l'anticorps secondaire approprié (voir tableau 7). Après un dernier rinçage dans le PBS 1X, la lame fut séchée et une goutte de milieu de montage *Vectashield* avec DAPI (Vectorlabs, Burlington, Canada) et une lamelle y ont été déposées. La fluorescence fut examinée et photographiée à l'aide d'un microscope *Leica DM LB2* (Leica microsystems, Wetzlar, Allemagne) et d'une caméra *Leica DC300* (Leica microsystems, Wetzlar, Allemagne).

**Tableau 7: Anticorps utilisés pour les immunofluorescences**

Anticorps primaire	Dilution	Anticorps secondaire fluorescent approprié	Dilution
Anti-PLZF	1 :50	Anti-mouse FITC (Vector laboratories)	1 :200
Anti-Cytokératine 18	1 :100	Anti-rabbit rhodamine (Chemicon)	1 :25

### **III- Résultats**

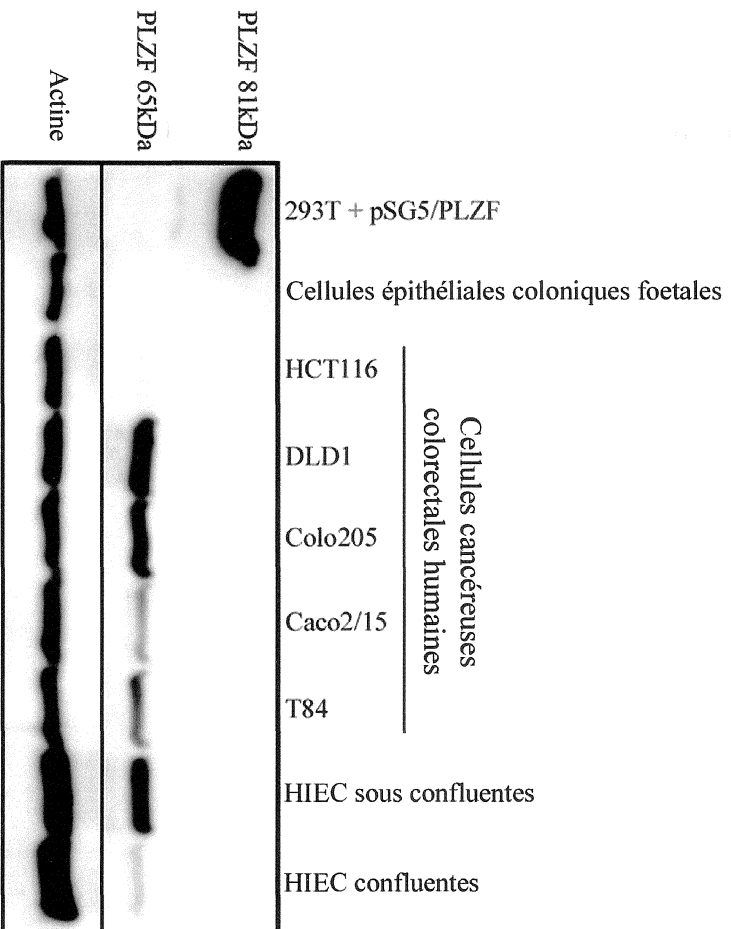
#### **1. Expression protéique de PLZF dans les cellules épithéliales intestinales humaines**

L'implication de PLZF dans le maintien des cellules souches spermatogoniales (Costoya et al, 2004 ; Buaas et al, 2004) et hématopoïétiques (Shaknovich et al, 1998) a permis de soulever l'hypothèse que PLZF pourrait être impliqué dans le maintien des cellules souches épithéliales intestinales. La première étape était donc de vérifier l'expression de PLZF dans l'épithélium intestinal. Pour ce faire, des extraits protéiques de cellules épithéliales de côlon fœtal humain de 19 semaines, de la lignée cellulaire HIEC, et des différentes lignées cancéreuses colorectales humaines (Caco-2/15, HCT-116, Colo205, T84 et DLD-1) ont été utilisés pour effectuer un immunobuvardage de type Western. Un contrôle composé d'un extrait protéique total de cellules 293T transfectées avec le vecteur pSG5/PLZF a servi de contrôle positif. L'analyse de cet immunobuvardage a permis de constater la présence d'une forme écourtée de PLZF (65 kDa) dans la majorité des lignées cancéreuses colorectales humaines, ainsi que dans les cellules HIEC. Cette petite forme de PLZF est également modulée en fonction de la confluence des cellules HIEC. Par contre, aucune forme de PLZF ne fut détectée dans les colonocytes fœtaux isolés par la technique de matrisperse (Figure 9).



**Figure 9. Expression de la protéine PLZF dans les cellules épithéliales intestinales fœtales et cancéreuses.**

Une expérience d'immunobuvardage de type Western a été effectuée avec des protéines totales extraites de cellules épithéliales de côlon fœtal humain, de cellules cancéreuses colorectales humaines (HCT116, DLD-1, Colo205, Caco-2/15 et T84) ainsi que de cellules cryptales d'iléon fœtal humain (HIEC) sous-confluentes et confluentes. Les protéines extraites de cellules 293T transfectées avec pSG5/PLZF ont été utilisées comme contrôle positif de l'expression de PLZF. Une forme écourtée de PLZF à environ 65 kDa a été identifiée dans la plupart des lignées cancéreuses colorectales humaines et dans les cellules HIEC. L'actine a été visualisée afin de s'assurer de la constance des quantités de protéines migrées.



## 2. Origine de PLZF 65 kDa

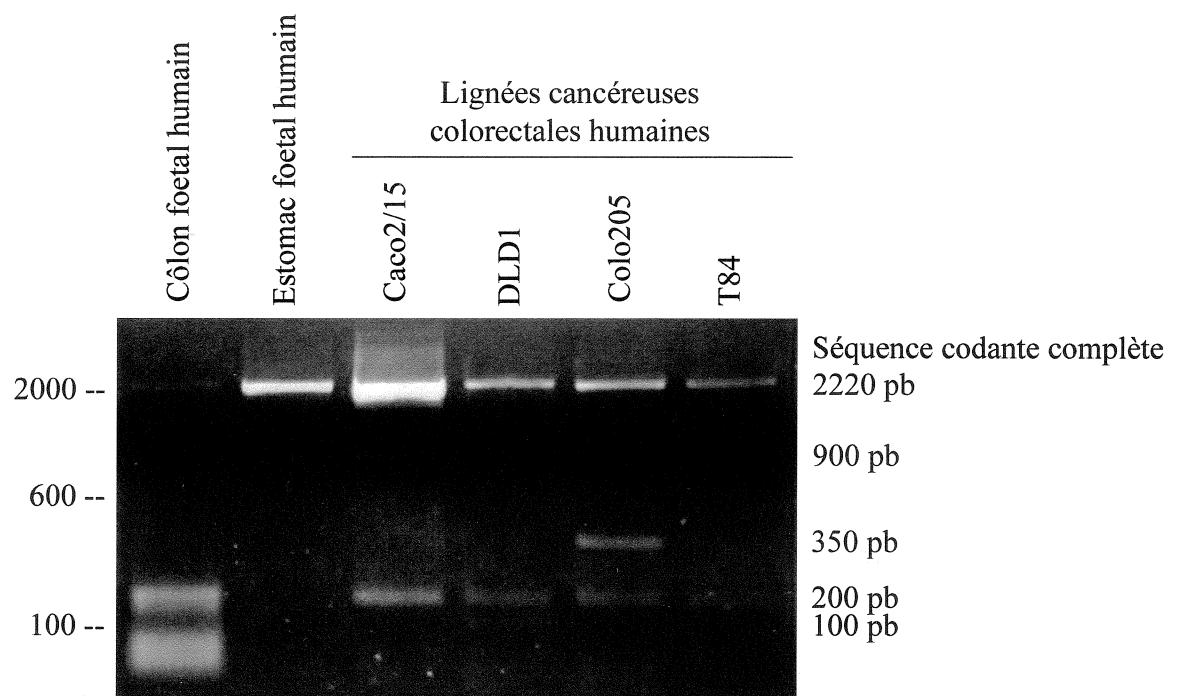
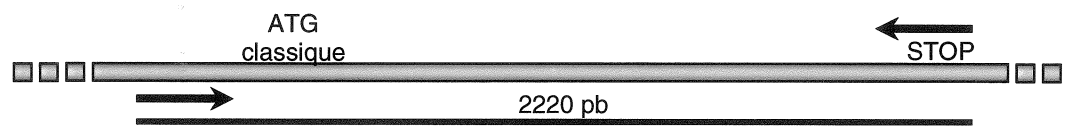
L'existence de PLZF 65 kDa n'avait jusqu'à maintenant jamais été soulevé dans la littérature. Par contre, il a été démontré que l'ARNm de PLZF pouvait subir de l'épissage alternatif, qui pourrait hypothétiquement résulter en la traduction d'une forme écourtée de la protéine PLZF (Zhang et al, 1999).

Afin de vérifier si la protéine PLZF 65 kDa pouvait provenir d'un ARNm épissé, un RT-PCR de la séquence codante complète de PLZF a été effectué. Les extraits d'ARN provenant de toutes les lignées cancéreuses présentant PLZF 65 kDa ont été utilisés pour cette analyse. Des extraits provenant de tissus fœtaux (côlon et estomac) ont également été analysés, l'estomac étant un contrôle positif de l'expression de l'ARNm de PLZF. Ces amplifications par PCR résultèrent en la production d'une bande correspondant à la séquence complète de PLZF, et ce, dans tous les échantillons. De plus, plusieurs bandes secondaires plus courtes furent observées. Par contre, le patron de ces bandes est très variable d'une lignée à l'autre. De plus, la longueur de ces séquences est théoriquement beaucoup trop courte pour mener à la traduction d'une protéine de 65 kDa (Figure 10). Il est donc peu probable que PLZF 65 kDa origine de la traduction à partir d'un ARNm épissé.

La production de protéines écourtées peut originer du clivage d'une protéine par une protéase. Afin de vérifier si PLZF 65 kDa dérive du clivage de PLZF 81 kDa, les lignées cancéreuses colorectales humaines Caco-2/15, Colo205 et T84 ont été soumises à des traitements avec différents inhibiteurs de protéases afin de

**Figure 10. Détection des formes épissées de l'ARNm de PLZF dans les cellules de tissus fœtaux et dans les cellules cancéreuses colorectales humaines.**

Un RT-PCR de la séquence codante complète de PLZF a été effectué en utilisant l'ARN extrait de tissus fœtaux tels que l'estomac et le côlon, ainsi que l'ARN extrait de lignées cancéreuses colorectales humaines telles que les Caco-2/15, les DLD-1, les Colo205 et les T84. La séquence complète fut détectée dans tous les types cellulaires. Des bandes supplémentaires ont également été identifiées, mais aucune d'entre elles ne pourrait mener théoriquement à la traduction d'une protéine de 65 kDa.



vérifier si l'inhibition de certaines protéases pouvait mener à une accumulation de PLZF 81 kDa au détriment de PLZF 65 kDa. Les inhibiteurs utilisés furent les suivants : le MG132, un inhibiteur de la sous-unité 20S du protéasome ; la calpeptin, un inhibiteur de cystéines protéases et des calpaïnes I et II ; l'EST, un inhibiteur de cystéines protéases et de calpaïnes ; et l'EDTA, un inhibiteur de métalloprotéases. Suite aux traitements, les protéines totales furent extraites et un immunobuvardage de type Western a été effectué. L'analyse a permis de visualiser qu'il n'y avait pas de modification du niveau d'expression de PLZF 65 kDa ni même accumulation de PLZF 81 kDa suite aux différents traitements, tel qu'illustré pour la lignée Caco-2/15 (Figure 11A). Cette observation démontre qu'aucune des protéases visées par ces différents inhibiteurs n'est impliquée dans la production de la forme écourtée de PLZF. Il est à noter que le même résultat a été obtenu suite au traitement des cellules T84 (données non montrées) et Colo205 (Figure 11B).

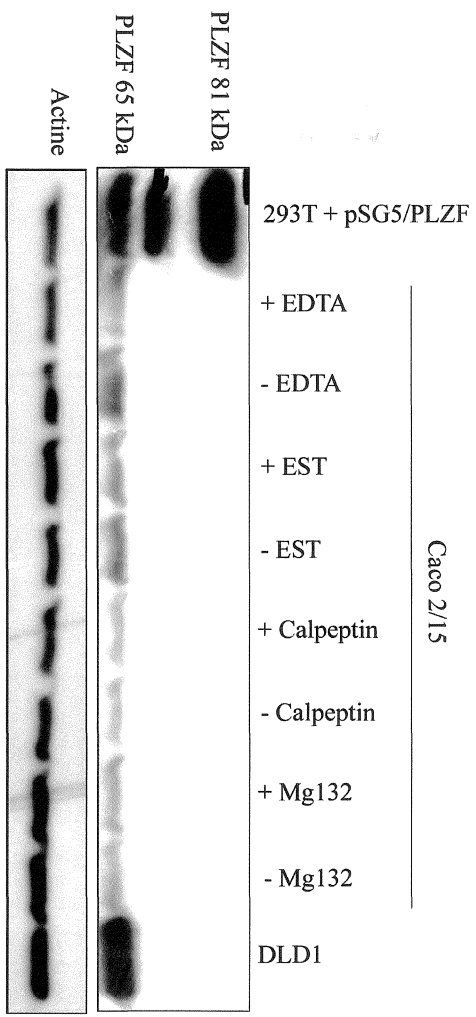
Une analyse détaillée de la séquence codant pour la protéine PLZF a par la suite mené à l'identification d'un second site d'initiation de la traduction composé d'un ATG précédé d'une séquence consensus de kozak parfaitement conservée, à la position 673 de la séquence humaine (Figure 12A). Ce site est également conservé chez plusieurs espèces (Figure 12B). La traduction à partir de ce site pourrait bel et bien mener à la production d'une protéine de 65 kDa. Afin de vérifier la nature potentielle de la traduction à partir de ce second site d'initiation ATG, un essai de transcription/traduction *in vitro* avec des réticulocytes de lapin a été effectué en utilisant une construction plasmidique dans laquelle le site classique d'initiation de la traduction fut muté en ATA (TOPO/PLZF1<sup>er</sup>ATG

**Figure 11. Analyse de l'effet de divers inhibiteurs de protéases sur le statut de PLZF 65 kDa dans diverses lignées cancéreuses colorectales humaines.**

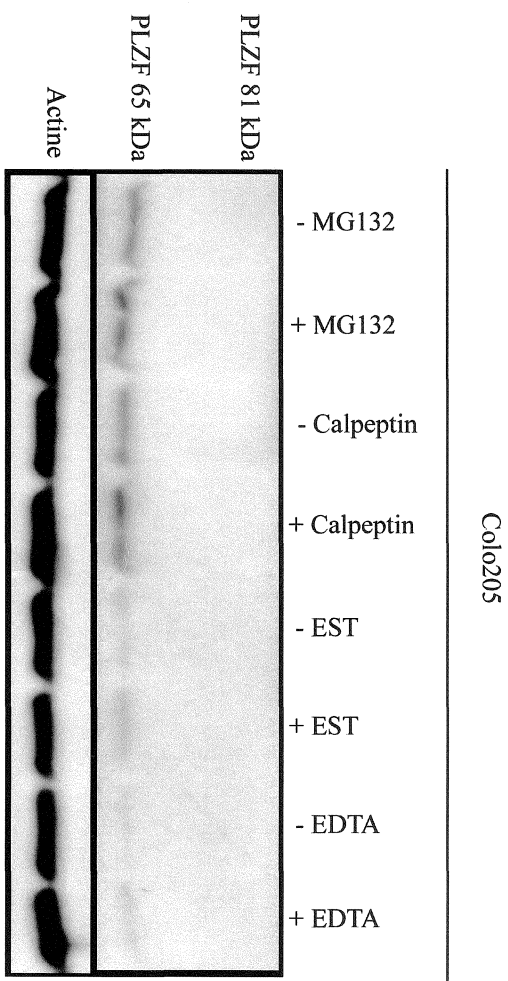
**A) Cellules Caco-2/15.** Afin de déterminer si PLZF 65 kDa pouvait originer du clivage de PLZF 81 kDa par une protéase, les cellules Caco-2/15 ont été traitées avec différents inhibiteurs de protéases. Les protéines extraites ont ensuite été utilisées pour un immunobuvardage de type Western, pour la détection de la protéine PLZF. Des protéines extraites de cellules 293T transfectées avec pSG5/PLZF et celles extraites de cellules DLD-1 ont été utilisées comme contrôle positif de l'expression de PLZF 81 et 65 kDa, respectivement. L'actine a été visualisée afin de s'assurer de la constance des quantités de protéines migrées.

**B) Cellules Colo205.** Les mêmes traitements ont été effectués sur les cellules Colo205 et les protéines extraites suite à ces traitements ont été analysées par immunobuvardage de type Western. L'actine a été visualisée afin de s'assurer de la constance des quantités de protéines migrées.

A



B





**Figure 12. Identification d'un second site d'initiation de la traduction pour PLZF.**

**A) Analyse de la séquence codante de PLZF.** L'analyse détaillée de la séquence codante de la protéine PLZF illustre la présence d'un second site d'initiation de la traduction composé d'un ATG et précédé d'une séquence consensus de Kozak parfaitement conservée, en position 673. S'il y avait traduction à partir de ce site, une protéine d'environ 65 kDa, sans domaine BTB/POZ, serait produite.

**B) Conservation du second site potentiel d'initiation de la traduction chez plusieurs espèces.** L'analyse des séquences codantes de PLZF de plusieurs espèces telles que la souris, le rat, le chien, l'opossum, le poulet, le taureau et le zebrafish a permis d'observer la présence du second site potentiel d'initiation de la traduction chez toutes ces espèces. La séquence consensus de Kozak (CC A/G CCATGG (Kozak, 1984)) est plus ou moins conservée, selon les espèces.

A

```

... 241 catgcctgag ccgaggggag caccatgat ctgacaaaaa tgggcatgat ccagctgcag
301 aaccctagcc accccacggg gctactgtgc aaggccaacc agatgcggct gccgggact
361 ttgtgcgatg tggtcacat ggtggacagc caggagtcc accccaccg gacgggtctg
421 gcctgcacca gcaagatgtt tgagatctc ttccaccgca atagtcaaca ctatacttg
481 gacttcctct cgccaaagac cttccagcag attctggagt atgcataac agccacgtg
541 caagccaagg cggaggacct ggatgacctg ctgtatggg ccgagatcct ggagatcgag
601 tacctggagg aacagtgcct gaagatgctg gagaccatcc aggcctcaga cgacaatgac
661 acggagcca ccatggccga tggcggggcc gaggaagaag aggaccgcaa ggctcggtac
721 ctcaagaaca cttcatctc gaagcattcc agcaggaga gtgggtatgc cagtgtggt...

```

B

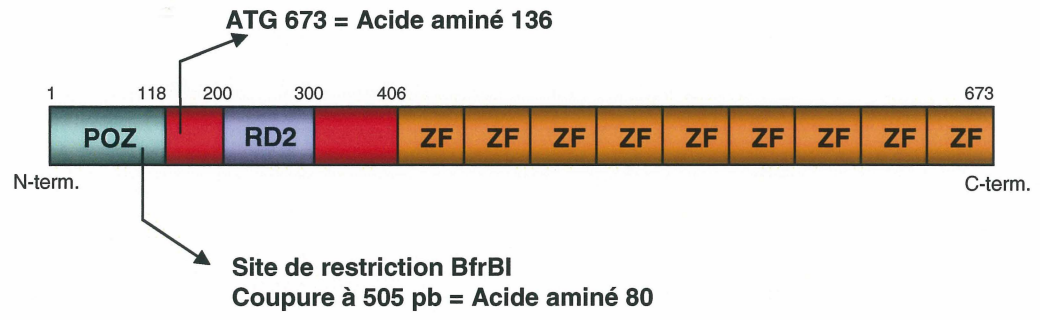
Espèces	Numéro d'assession Pubmed	Position du second ATG	Distance par rapport à l'ATG classique	Séquences
Homo sapiens (Humain)	NM_006006	673	+ 408 nt	5'...atgacacggagccaccatggccgatggggccgagg...3'
Mus musculus (Souris)	NM_001033324	656	+ 408 nt	5'...aatgacacagagccaccatgtgacgggtggggcgaagaa...3'
Rattus norvegicus (Rat)	NM_001013181	569	+ 408 nt	5'...aatgacacagaaaccaccatggccgacgggtggggcgaag...3'
Canis familiaris (Chien)	XM_845250	790	+ 408 nt	5'...aatgacacggagccaccatggctgatgggtgggcccagg...3'
Gallus gallus (Poulet)	XM_417898	479	+ 393 nt	5'...aacgatgccgaagtcaccatgacgatggaggtgccgatg...3'
Monodelphis domestica (Opossum)	XM_001381189	408	+ 408 nt	5'...aatgacacagagaccaccatggcagacgggtggcggcagg...3'
Danio rerio (Zebrafish)	NM_199635	563	+ 408 nt	5'...aatgacactgaggtgaacatgaacgatggtggcacagaag...3'
Bos taurus (Taureau)	BC_108094	672	+ 408 nt	5'...aatgacacggagccaccatggccgaggcggggcccagg...3'

**Figure 13. Utilisation d'un second site d'initiation de la traduction *in vitro*.**

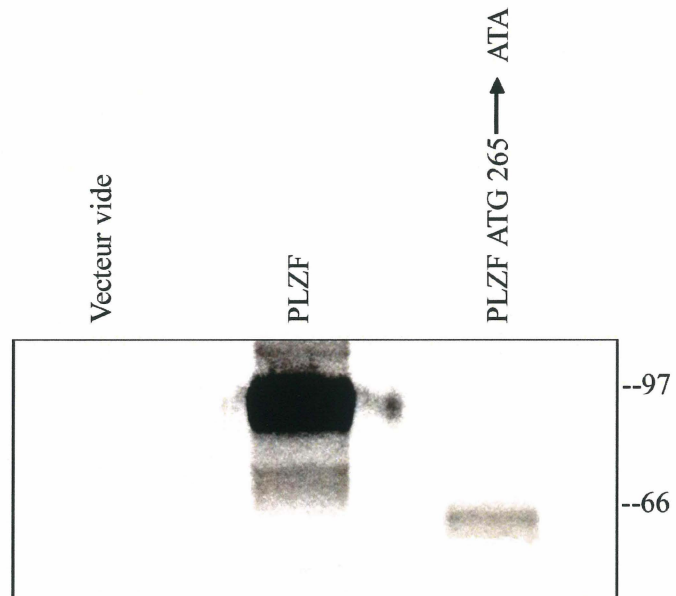
**A) Retrait du site classique d'initiation de la traduction.** La traduction à partir de l'ATG 673 mènerait à la production d'une protéine ne possédant pas de domaine BTB/POZ. Le site de restriction BfrBI, à la position 505 pb sera utilisé pour retirer l'ATG classique de la séquence de PLZF et ainsi vérifier la traduction à partir de l'ATG 673 dans le contexte cellulaire.

**B) Le site d'initiation de la traduction en position 673 est fonctionnel pour la traduction protéique *in vitro*.** Un essai de transcription/traduction *in vitro* avec des réticulocytes de lapin a été effectué afin de vérifier si le second site d'initiation de la traduction en position 673 peut être utilisé *in vitro*. Une mutation du premier ATG en ATA a été effectuée afin de favoriser l'utilisation du deuxième ATG (TOPO/PLZF1<sup>er</sup>ATG → ATA). Un vecteur vide et le vecteur pSG5/PLZF ont été utilisés comme contrôle négatif, et comme contrôle positif de l'expression de PLZF 81 kDa, respectivement.

**A**



**B**



→ ATA). Un contrôle négatif (vecteur vide) et un contrôle positif pour PLZF 81 kDa (pSG5/PLZF) ont été également testés simultanément. L'analyse de l'essai permet de confirmer que ce second site d'initiation de la traduction est fonctionnel et mène à la production d'une protéine de 65 kDa *in vitro* (Figure 13B).

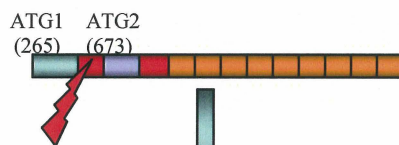
Afin de vérifier l'utilisation de l'ATG 673 dans les cellules, le 1<sup>er</sup> site d'initiation de la traduction a été retiré pour former le clone pBabe/PLZFΔ1<sup>er</sup>ATG. Dans cet ADN, l'utilisation du second site sera favorisée étant donné l'absence du site classique. Une transfection de pBabe puro/PLZFΔ1<sup>er</sup>ATG et de pBabe puro/PLZF (utilisé comme contrôle positif) a été effectuée dans les cellules 293T. 48 heures après la transfection, les protéines ont été extraites et un immunobuvardage de type Western a été effectué, en utilisant les cellules DLD-1 et T84 comme contrôle positif de PLZF 65 kDa (Figure 14). L'utilisation favorisée du second site d'initiation de la traduction permet en effet la production d'une protéine de 65 kDa, migrant exactement à la même hauteur que la forme de PLZF retrouvée dans les lignées cancéreuses colorectales humaines. Donc, le second site d'initiation de la traduction peut bien être utilisé pour la production d'une protéine de 65 kDa et ce, même dans le contexte cellulaire.

Afin de confirmer à nouveau l'origine de PLZF 65 kDa, une immunoprécipitation a été effectuée. pSG5/PLZF-*Flag* a d'abord été transfecté dans les cellules 293T. L'anticorps *Flag* et l'anticorps PLZF ont ensuite été utilisés pour effectuer deux immunoprécipitations en parallèle. Étant donné la présence de l'étiquette *Flag* en amont de PLZF, une immunoprécipitation avec l'anticorps *Flag* ne devrait pas permettre la précipitation de la protéine de 65 kDa,

**Figure 14. Utilisation d'un second site d'initiation de la traduction dans les cellules 293T.**

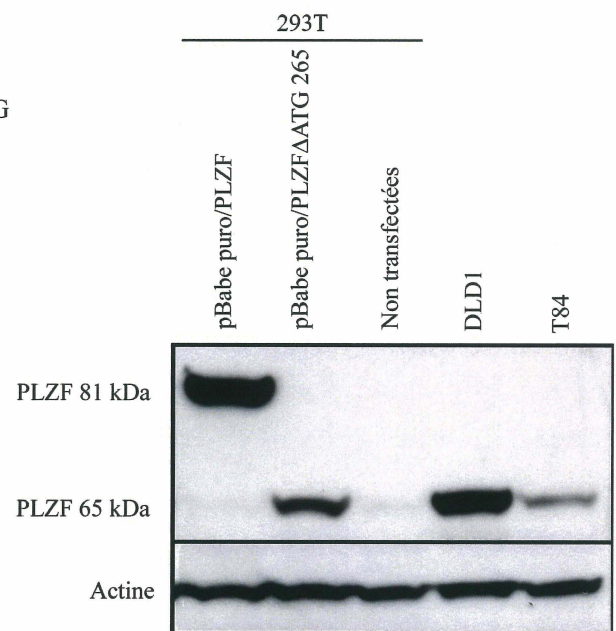
Afin de déterminer si le nouvel ATG identifié peut également être utilisé pour la traduction protéique dans les cellules, un immunobuvardage de type Western a été effectué pour la détection de PLZF. Les protéines utilisées ont été extraites à partir de cellules 293T transfectées avec pBabe puro/PLZF (pour la surexpression de PLZF 81 kDa) ou pBabe puro/PLZFΔ1<sup>er</sup>ATG, dans lequel a été retiré le premier ATG par digestion enzymatique afin de favoriser l'utilisation de l'ATG 673. Des extraits de cellules 293T non transfectées ont servi de contrôle négatif et des extraits de cellules DLD-1 et T84 ont été utilisés comme contrôle positif de l'expression de PLZF 65 kDa. L'actine a été visualisée afin de s'assurer de la constance des quantités de protéines migrées.

Digestion de l'ADN entre le 1<sup>er</sup> et le 2<sup>e</sup> ATG



Clonage dans pBabe puro

Transfection dans 293T



alors que l'immunoprécipitation avec l'anticorps PLZF devrait la permettre. En effet, un immunobuvardage de type Western pour la visualisation de la protéine PLZF a permis de constater l'absence de la forme écourtée pour l'immunoprécipitation *Flag* alors qu'elle était présente pour l'immunoprécipitation PLZF (Figure 15). Cette observation supporte l'hypothèse que PLZF 65 kDa provient de la traduction à partir d'un second site d'initiation. Puisque PLZF 81 kDa est détectable dans les deux types d'immunoprécipitations, l'absence de la petite forme dans l'immunoprécipitation *Flag* n'est pas due à une précipitation inefficace. Toutes ces observations suggèrent que PLZF 65 kDa originerait d'un second site d'initiation de la traduction, situé en aval de l'ATG classique.

### **3. Localisation de PLZF 65 kDa dans la cellule épithéliale intestinale**

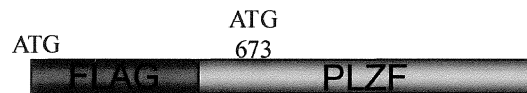
La traduction à partir d'un second site dans PLZF mène à la production d'une protéine dans laquelle le domaine BTB/POZ est absent (Figure 13A). Dans la littérature, il a été soulevé à quelques reprises que ce domaine était essentiel pour la bonne localisation de PLZF (Melnick et al, 2000 ; Dong et al, 1996 ; Koken et al, 1997). Pour vérifier la localisation de cette nouvelle forme de PLZF, des fractionnements cellulaires ont été effectués afin de séparer les protéines de chacun des compartiments cellulaires suivants : le cytosol, les membranes et les organelles, le noyau et le cytosquelette. Un immunobuvardage de type Western a été effectué avec ces extraits afin de visualiser la présence de PLZF 65 kDa dans chacun de ces compartiments, ce qui a permis de constater que cette forme écourtée de PLZF était restreinte au cytosquelette et absente du noyau (Figure 16A). Des immunobuvardages avec différents anticorps (Histone H1, cytokératine



**Figure 15. Transfection de PLZF étiqueté *Flag* dans les cellules 293T et immunoprécipitations avec les anticorps *Flag* et PLZF.**

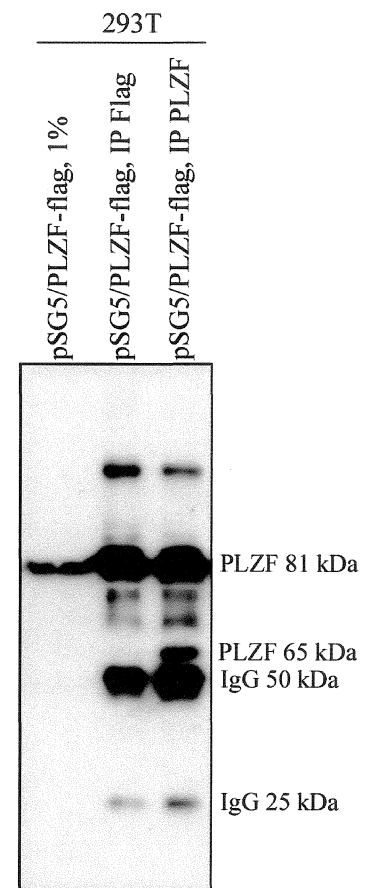
Des cellules 293T ont été transfectées avec le vecteur pSG5/PLZF-*Flag*, avant de subir une lyse protéique et une immunoprécipitation avec un anticorps anti-PLZF ou anti-*Flag*. Un immunobuvardage de type Western a ensuite été effectué afin de détecter les protéines PLZF précipitées. 1% de la lyse protéique a été utilisé comme contrôle positif (*Input*). Les résultats obtenus suggèrent que la production de PLZF 65 kDa proviendrait de la traduction à partir d'un second site d'initiation de la traduction interne.

Tranfection de pSG5/PLZF-Flag dans les cellules 293T



Immunoprécipitation avec l'anticorps Flag ou PLZF

Immunobuvardage de type Western avec l'anticorps PLZF



18, et  $\alpha$ -tubuline) ont permis de valider l'intégrité des différents compartiments cellulaires. Le même résultat a été obtenu avec les protéines des compartiments cellulaires des cellules Colo205, T84 et DLD-1 (Figure 17A).

La localisation de PLZF 65 kDa au niveau du cytosquelette a été validée par immunofluorescence. Les cellules cancéreuses colorectales humaines (Caco-2/15, les Colo205, les DLD-1 et les T84) ont été utilisées puisqu'elles n'expriment que la forme de 65 kDa de PLZF. L'immunofluorescence a été effectuée à la fois avec l'anticorps PLZF et l'anticorps de la cytokératine 18 afin de s'assurer que PLZF 65 kDa est bien localisé au niveau du cytosquelette. Bien que l'appareillage utilisé soit limité pour la démonstration d'une colocalisation cellulaire fine, l'observation de la fluorescence par microscopie a tout de même permis de suggérer que PLZF 65 kDa et la cytokératine 18 colocalisent bien au niveau du cytosquelette (Figure 16B). Il est à noter que le même résultat a été obtenu avec les lignées T84 (Figure 17B), Colo205, et DLD-1 (données non montrées).

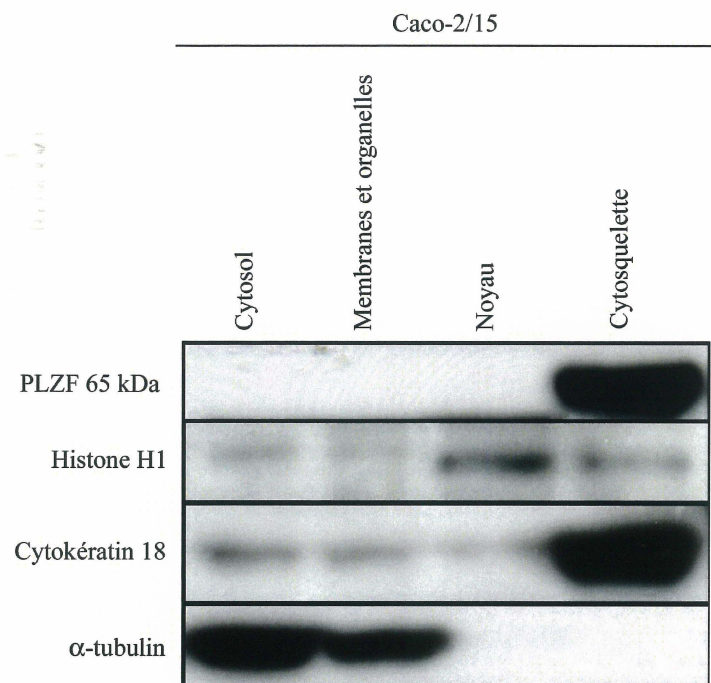
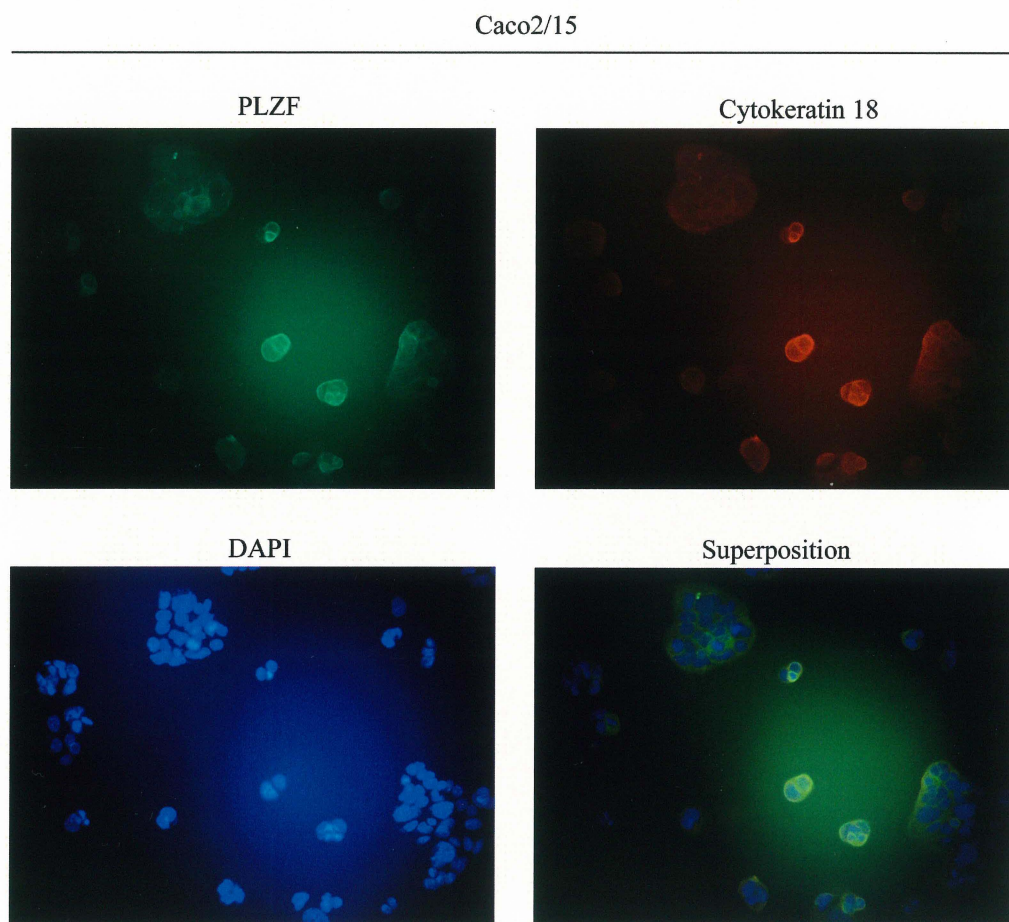
#### **4. Profil d'expression de PLZF 65 kDa au cours de la prolifération et la différenciation cellulaire**

Les cellules Caco-2/15 ont la particularité d'entamer un processus de différenciation à l'atteinte de la confluence (Pinto et al, 1983 ; Beaulieu et Quaroni, 1991). Les protéines totales de cellules Caco-2/15 ont été extraites à confluence variable, passant d'une population de cellules sous-confluentes indifférenciées (40% confluentes, 80% confluentes) à une population confluyente en cours de différenciation (100% confluyente, + 2 jours post-confluence, + 7 jours

**Figure 16. Localisation de PLZF 65 kDa au niveau du cytosquelette des cellules Caco-2/15.**

**A)** Afin de déterminer la localisation de PLZF 65 kDa dans les cellules Caco-2/15, des extraits protéiques des différents compartiments cellulaires (cytosol, membranes et organelles, noyau et cytosquelette) ont été effectués. Un immunobuvardage de type Western pour la détection de la protéine PLZF a été effectué. L'histone H1, la cytokératine 18, et l' $\alpha$ -tubuline ont été visualisées afin de valider les différentes fractions cellulaires.

**B)** Les cellules Caco-2/15, qui expriment uniquement PLZF 65 kDa, ont été utilisées pour une expérience d'immunofluorescence indirecte. La détection de PLZF a été effectuée en même temps que celle de la cytokératine 18, afin de s'assurer que la fluorescence visualisée est bien localisée au niveau du cytosquelette.

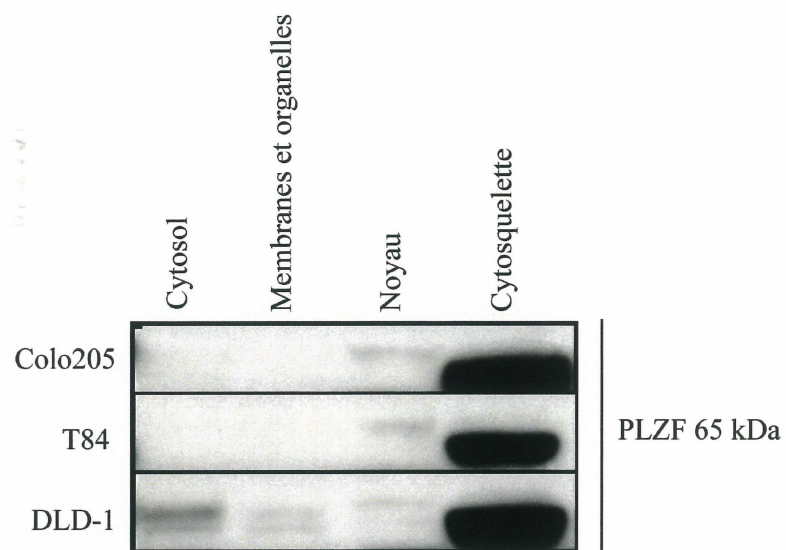
**A****B**

**Figure 17. Localisation de PLZF 65 kDa au niveau du cytosquelette des cellules cancéreuses colorectales Colo205, T84 et DLD1.**

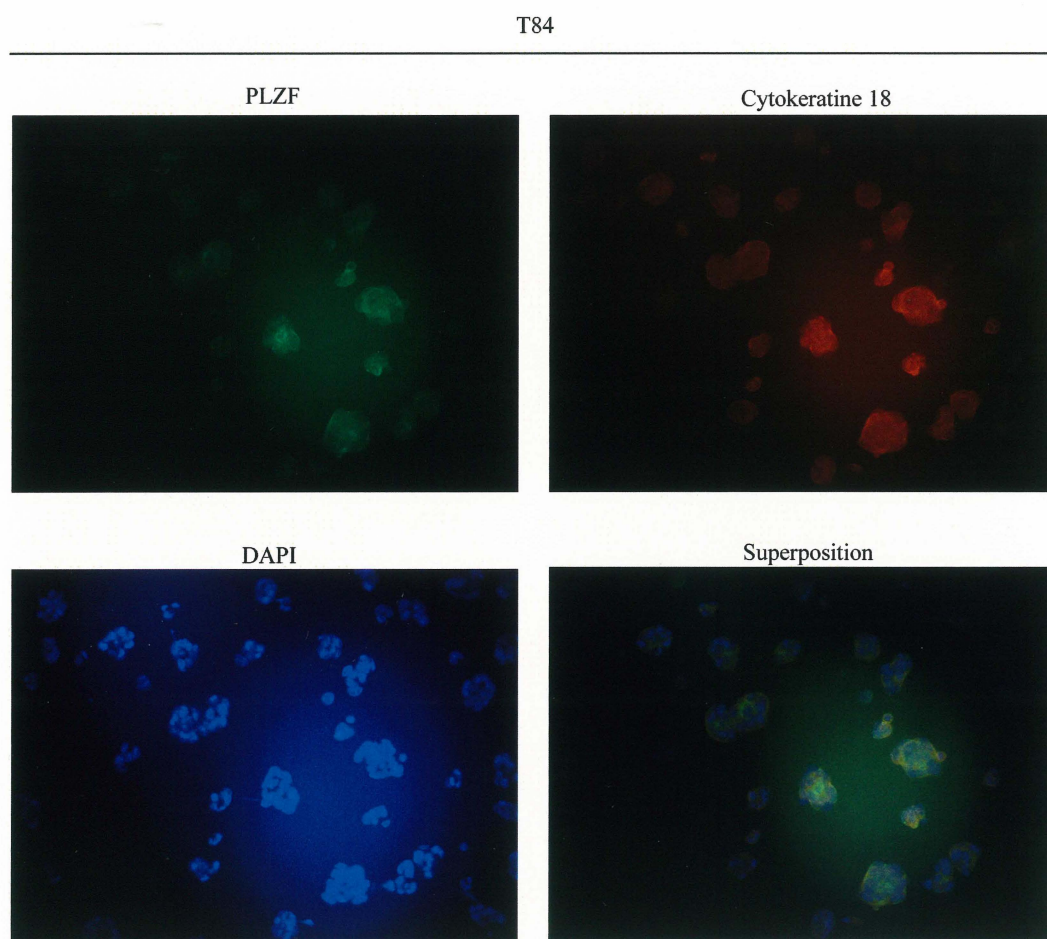
**A)** La localisation de la forme écourtée de PLZF dans des lignées cancéreuses colorectales autres que les Caco-2/15 a été vérifiée. Des extraits protéiques obtenus suite au fractionnement des compartiments cellulaires des cellules Colo205, T84 et DLD-1 ont été utilisés pour une analyse par immunobuvardage de type Western pour la détection de la protéine PLZF.

**B)** La localisation de PLZF 65 kDa au niveau du cytosquelette des cellules cancéreuses colorectales humaines a été confirmée par immunofluorescence. La colocalisation de PLZF avec la cytokératine 18 dans les cellules T84 permet de s'assurer d'une présence réelle de PLZF 65 kDa au niveau du cytosquelette. Il est à noter que le même résultat a été obtenu avec les Colo205 et les DLD-1.

**A**



**B**



post-confluence et + 14 jours post-confluence). Un immunobuvardage de type Western a ensuite été effectué avec ces protéines. L'expression de la protéine écourtée de PLZF diminue graduellement en fonction de la confluence (Figure 18A et B). L'expression protéique de PLZF 65 kDa est donc plus forte dans les cellules prolifératives et diminue au cours de la différenciation épithéliale intestinale.

## **5. Expression et localisation de PLZF *in vivo***

Afin de déterminer si PLZF 65 kDa est présent dans les cellules épithéliales intestinales *in vivo*, et afin de vérifier s'il est bien localisé au niveau du cytosquelette des cellules, le fractionnement des compartiments cellulaires de cellules provenant de l'épithélium colonique de souris a été effectué. L'isolement des cellules intestinales avait d'abord été effectué en utilisant la technique de Weiser telle que décrite dans la section 2.2.2. L'ensemble des cellules de certaines fractions intactes fut utilisé pour l'extraction protéique et l'analyse de type Western. Une bande correspondant à PLZF 65 kDa est observée dans les échantillons correspondant au cytosquelette des cellules épithéliales coloniques (Figure 19). Ce résultat signifie que cette protéine est bien présente dans l'épithélium intestinal, et qu'elle se retrouve bien au niveau du cytosquelette de ces cellules.

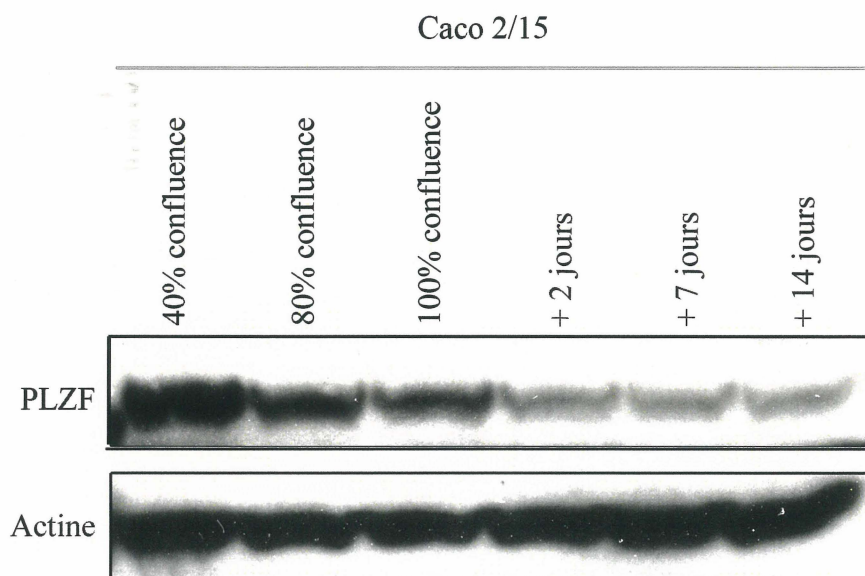


**Figure 18. Expression de PLZF 65 kDa au cours de la transition prolifération/différenciation des cellules Caco-2/15.**

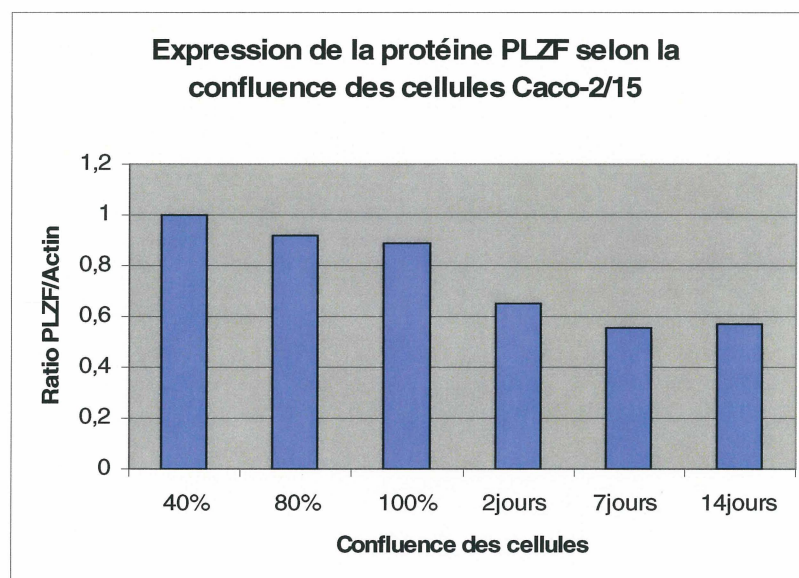
**A)** Un immunobuvardage de type Western a été effectué avec des protéines extraites de cellules Caco-2/15 à des confluences allant de 40% confluence à 14 jours post-confluence et ce, pour la détection de la protéine PLZF. L'actine a été visualisée afin de s'assurer de la constance des quantités de protéines migrées.

**B)** L'analyse densitométrique des bandes obtenues suite à l'immunobuvardage de type Western a permis de déterminer le ratio PLZF/Actine.

**A**



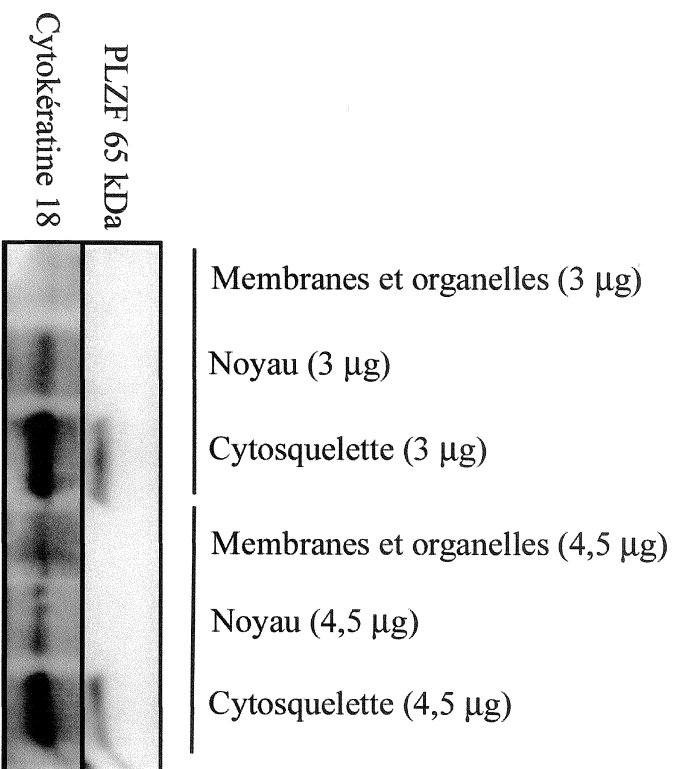
**B**



**Figure 19. Localisation de PLZF 65 kDa dans le cytosquelette des cellules épithéliales coloniques de souris.**

Un fractionnement des compartiments cellulaires de cellules épithéliales coloniques recueillies grâce à la technique de Weiser a été effectué. La détection de la protéine PLZF a ensuite été effectuée grâce à un immunobuvardage de type Western. La cytokératine 18 a été visualisées afin de valider la fraction correspondant au cytosquelette.

Cellules épithéliales coloniques de souris



## **IV- Discussion**

### **1. Une forme écourtée de la protéine PLZF est identifiée dans les cellules cancéreuses colorectales humaines et dans les cellules normales de la crypte d'iléon humain.**

La présence de l'ARNm de PLZF a été notée dans différents organes murins adultes tels que le cœur, la rate, le cerveau, le muscle, le poumon et le testicule (Reid et al, 1995). Par contre, l'expression de l'ARNm ou de la protéine PLZF au niveau de l'intestin grêle et du côlon n'a jusqu'à maintenant jamais été rapportée dans la littérature. Cette présente étude avait donc pour objectif principal l'analyse de l'expression génique et protéique, et l'étude du rôle de PLZF au niveau des cellules épithéliales intestinales et coloniques. Étant donné son implication dans le maintien des cellules souches hématopoïétiques (Shaknovich et al, 1998) et spermatogoniales (Costoya et al, 2004, Buaas et al, 2004, Kotaja et Sassone-Corsi, 2004), l'implication potentielle de PLZF dans le maintien des cellules souches épithéliales intestinales fut un élément important dans la poursuite de cette présente étude.

La première étape consistait alors à vérifier l'expression protéique de PLZF dans différentes lignées cellulaires intestinales comprenant des lignées cancéreuses colorectales humaines, une lignée cryptale provenant d'iléon fœtal humain, ainsi que des cellules épithéliales de côlon fœtal humain. Une bande correspondant à un poids moléculaire de 65 kDa, présente dans la plupart des lignées cancéreuses colorectales, ainsi que dans les cellules HIEC, a permis l'identification d'une

forme écourtée de la protéine PLZF. Une expérience avec des cellules épithéliales intestinales et coloniques recueillies grâce à la technique de Weiser a permis de confirmer que PLZF 65 kDa est bel et bien exprimé au niveau de l'épithélium intestinal de souris. Cependant, cette nouvelle forme de la protéine semble absente dans les cellules épithéliales de côlon fœtal humain. Il est toutefois possible que PLZF soit bien présent au niveau du côlon humain mais que cette expérience n'ait pas permis sa détection. S'il se retrouve bel et bien exprimé au niveau des cellules souches de l'épithélium intestinal, il est possible qu'il soit faiblement exprimé dans ce pool de cellules épithéliales. Il est également possible que la solution matrisperse n'ait pas permis de détacher toutes les cellules situées au fond des cryptes, ce qui pourrait expliquer l'absence de PLZF. D'autres analyses devront être effectuées pour confirmer l'expression de cette protéine dans le côlon et l'intestin grêle humain, tant au niveau du développement que chez l'adulte.

## **2. Détermination de l'origine de PLZF 65 kDa.**

Suite à l'identification de la nouvelle forme de PLZF, une étude sur l'origine de cette protéine écourtée a été effectuée. Trois hypothèses quant à l'origine de PLZF 65 kDa furent vérifiées.

Une forme écourtée d'une protéine peut apparaître suite à l'épissage alternatif de son ARNm. Une expérience de RT-PCR a permis de visualiser les différentes séquences épissées de l'ARNm du gène PLZF. La séquence codante complète de PLZF fut détectée dans tous les échantillons testés, incluant ceux provenant des lignées cancéreuses colorectales humaines exprimant uniquement la forme de 65

kDa. Ce résultat démontre que l'ARNm complet de PLZF est exprimé au niveau des cellules cancéreuses colorectales, ainsi que dans les cellules provenant de tissus fœtaux tels que l'estomac et le côlon. Dans la littérature, il a été préalablement rapporté que la séquence codante de PLZF peut subir de l'épissage alternatif menant à la production d'ARNm plus courts (Zhang et al, 1999). La présence de bandes plus courtes suite à notre expérience de RT-PCR suggère l'existence de formes épissées de PLZF dans certaines de ces cellules intestinales. Le séquençage de plusieurs de ces bandes a permis de confirmer qu'elles correspondaient bien à PLZF. Par contre, la taille de ces différents ARNm n'est pas suffisante pour mener à la traduction d'une protéine de 65 kDa, ce qui écarte l'hypothèse de l'épissage alternatif comme cause de l'existence de la forme écourtée de PLZF.

Le clivage d'une protéine par une protéase, donnant naissance à une protéine plus courte, fut une hypothèse possible pour expliquer l'origine de PLZF 65 kDa. Ce mécanisme fut rapporté pour d'autres protéines telles que la protéine ancrée à la membrane *proHB-EGF*, qui est clivée par la métalloprotéase *ADAM 9, 10, 12* ou *17*. Ce clivage donne naissance à une forme soluble, *HB-EGF*, qui peut agir ensuite comme un élément clé dans le processus de transactivation du récepteur à l'EGF (Nanba et al, 2003). Il était possible qu'un phénomène semblable se produise dans le cas de PLZF qui, suite à son clivage, pourrait acquérir une nouvelle fonction. Les cellules Caco-2/15, T84 et Colo205, exprimant uniquement la forme de 65 kDa de PLZF, ont été traitées avec différents inhibiteurs de protéases, visant entre autres le protéasome (MG132), des cystéines protéases (Calpeptin, EST), les calpaïnes (Calpeptin, EST) et des métalloprotéases (EDTA).

Si PLZF 65 kDa originait bien du clivage de PLZF 81 kDa par l'une de ces protéases, l'inhibition de celle-ci résulterait en une diminution de PLZF 65 kDa et en une accumulation de PLZF 81 kDa qui ne serait alors plus clivé. L'analyse du résultat obtenu nous permet de rejeter l'implication des protéases visées par les traitements au MG132, au calpeptin, à l'EST et à l'EDTA, dans la production de PLZF 65 kDa.

La troisième hypothèse nécessitait la présence d'un second site d'initiation de la traduction en aval de l'ATG classique. L'analyse détaillée de la séquence codante de PLZF a en effet mené à l'identification d'un second site d'initiation de la traduction, composé d'un ATG, précédé d'une séquence consensus de Kozak parfaitement conservée (Kozak, 1989 ; Kozak, 1984) et ce parmi plusieurs espèces. Cet ATG, situé à la position 673, permettrait théoriquement la traduction d'une protéine d'environ 65 kDa. L'analyse informatique par deux différents logiciels retrouvés sur internet (Expasy et Protparam) a effectivement permis de prédire le poids moléculaire approximatif de la protéine qui serait potentiellement produite à partir de l'ATG 673.

Plusieurs expériences ont dûes être effectuées afin de vérifier si cet ATG pouvait bien être utilisé pour la traduction en protéine de 65 kDa et ce, autant *in vitro* que dans le contexte cellulaire. La mutation ou le retrait de l'ATG classique a permis de favoriser l'usage probable du second site potentiel d'initiation de la traduction (ATG 673) dans les différents essais. Tout d'abord, un essai de transcription/traduction *in vitro* a permis de suggérer l'utilisation de ce nouvel ATG pour la production d'une protéine de 65 kDa *in vitro*. L'utilisation de l'ATG



673 dans les cellules a été étudiée à son tour dans la lignée 293T, qui produisait, lorsque transfectée avec le vecteur pBabe puro/PLZFΔ1<sup>er</sup>ATG, une protéine de la même taille que celle retrouvée dans les cellules cancéreuses colorectales humaines. Ces observations suggèrent que PLZF 65 kDa originerait de ce second site d'initiation de la traduction.

Une expérience d'immunoprécipitation a permis d'appuyer d'avantage cette hypothèse. La transfection de la construction pSG5/PLZF-*Flag* dans les cellules 293T a d'abord été effectuée. L'étiquette *Flag* se trouve en amont de PLZF dans cette construction, ce qui signifie que l'initiation de la traduction à partir d'un site interne ne devrait pas permettre la traduction de l'étiquette. La petite forme de 65 kDa retrouvée dans ces cellules ne devrait donc pas être précipitée par l'anticorps *Flag*, mais devrait se retrouver dans le pool de protéines précipitées par l'anticorps PLZF. C'est ce qui a été observé suite à cette expérience, ce qui appuie à nouveau l'hypothèse que PLZF 65 kDa proviendrait de la traduction à partir de l'ATG en position 673.

Bien que ces différents résultats suggèrent que PLZF 65 kDa est produit suite à la traduction à partir d'un site d'initiation interne situé à la position 673 de la séquence codante, une expérience de mutagenèse dirigée de ce site sera essentielle pour confirmer hors de tout doute ces observations. Il est intéressant de noter que la production d'une protéine ne possédant pas de domaine BTB/POZ remet donc en doute le rôle de répresseur transcriptionnel pour cette forme écourtée de PLZF.

L'existence d'une forme écourtée provenant du même ARNm que PLZF 81 kDa pourrait expliquer en partie les rôles contradictoires de PLZF soulevés dans la littérature. Dans une grande proportion des articles publiés, seules les modulations de l'expression génique ont été évaluées. Les variations d'expression de l'ARNm peuvent autant mener à une variation de l'expression protéique de la grande (81 kDa) ou de la petite (65 kDa) forme de PLZF. L'isoforme précise impliquée dans les processus cellulaires étudiés demeure alors inconnue. Parmi les contradictions soulevées, on retrouve par exemple le fait que l'expression du gène PLZF diminue lors de la différenciation de la plupart des lignées hématopoïétiques (Chen et al 1993 ; Reid et al, 1995 ; Labbaye et al, 2002), alors qu'elle augmente de façon significative lors de la différenciation ostéoblastique (Ikeda et al, 2004) ou mégacaryocytaire (Labbaye et al, 2002). De plus, dans le développement, PLZF joue un rôle pro-apoptotique dans les espaces interdigitaux (Barna et al, 2000), alors qu'il confère aux cellules myéloïdes et lymphocytaires une résistance à l'apoptose induite par un stress (Shaknovich et al, 1998 ; Parrado et al, 2004), et ce via la répression du pro-apoptotique BID. Ces exemples de rôles contradictoires pourraient être expliqués par la présence de différentes formes de PLZF. L'expression des différentes isoformes de PLZF pourrait se faire de façon tissu-spécifique, et varier selon l'état différencié ou indifférencié, prolifératif ou encore quiescent des cellules.

Mais quels seraient les mécanismes potentiellement impliqués dans l'utilisation différentielle de multiples sites d'initiation de la traduction par la cellule ?

Deux possibilités sont actuellement proposées pour expliquer l'utilisation différentielle de divers sites d'initiation de la traduction. La première hypothèse suggère que, par un mécanisme encore inexpliqué, il y aurait blocage de la traduction à partir du site d'initiation classique, ce qui pousserait par défaut la traduction à partir d'un second site, situé plus en aval dans la séquence. Le blocage pourrait se faire, par exemple, via une molécule, une protéine ou via un complexe protéique qui, en se liant à la séquence, empêcherait la machinerie traductionnelle de commencer son travail à partir de cet endroit. Une modification du codon AUG classique dans certains types de cellules pourrait également expliquer l'absence de traduction à partir du site classique d'initiation. Dans le cas de PLZF, le « système de blocage » serait toujours présent au niveau des cellules épithéliales intestinales puisque que la forme de 81 kDa n'a jamais été observée dans ce type de cellules. Par contre, la possibilité qu'une modification dans la séquence soit responsable de ce type de blocage est rejetée puisque de nombreux séquençages ont permis de démontrer qu'il n'y avait pas de différence au niveau de la séquence du site d'initiation de la traduction classique. La seconde option pouvant expliquer l'utilisation différentielle de divers sites d'initiation de la traduction est appuyée sur des données de la littérature (Jackson R.J., 2005 ; Spriggs et al, 2005 ; Baird et al, 2006) qui proposent deux différents mécanismes d'initiation de la traduction, le premier nécessitant le recrutement de la machinerie traductionnelle au niveau de la coiffe en 5' ainsi qu'un balayage de la séquence jusqu'au premier AUG rencontré, et le second mécanisme nécessitant la présence d'une séquence *IRES* (*Internal Ribosomal Entry Site*), permettant le recrutement des sous-unités ribosomales ainsi que l'initiation de la traduction à partir d'un site interne. La présence d'un motif *IRES* en aval de l'AUG classique et en amont de celui en position 673 pourrait

expliquer la traduction de PLZF 65 kDa, malgré que le site en position 673 ne soit pas celui situé le plus en 5'. Étant donné la nature mal détaillée des motifs *IRES*, la mauvaise compréhension de leur fonctionnement et l'absence de séquence consensus connue (Komar & Hatzoglou, 2005 ; Baird et al, 2006), il n'est pas possible de savoir immédiatement s'il y a bel et bien présence d'un tel site dans la séquence codante de PLZF. Par contre, l'étude détaillée de cette hypothèse serait intéressante pour la poursuite de ce projet.

### **3. PLZF 65 kDa est localisé dans le cytosquelette des cellules cancéreuses colorectales humaines et des cellules épithéliales coloniques de souris.**

L'intégrité du domaine BTB/POZ de PLZF est essentielle pour une localisation nucléaire normale de la protéine (Melnick et al, 2000 ; Dong et al, 1996 ; Koken et al, 1997). Ce domaine est également requis pour la répression transcriptionnelle par PLZF, puisque c'est lui qui permet le recrutement des corépresseurs N-CoR, SMRT et Sin3A, ainsi que des HDACs, au niveau du promoteur cible (Hong et al, 1997 ; Wong et Privalsky, 1998 ; David et al, 1998 ; Melnick et al 2002). Étant donné l'absence du domaine BTB/POZ dans la forme écourtée de PLZF, rendant la fonction de répresseur et la localisation nucléaire incertaines, une étude plus approfondie de la localisation de PLZF 65 kDa a dû être effectuée. La séparation des différents compartiments cellulaires des cellules Caco-2/15 et l'extraction de leurs protéines de façon séparée ont permis de vérifier si PLZF 65 kDa était localisé au niveau du noyau, comme c'est le cas pour PLZF 81 kDa. Il semblerait en effet que l'absence du motif BTB/POZ entraînerait une modification de la localisation de la protéine de 65 kDa. La présence de la forme écourtée au niveau

du cytosquelette des cellules Caco-2/15 et des autres lignées cancéreuses colorectales a été constatée par immunobuvardage de type Western, et a été confirmée par immunofluorescence indirecte, ce qui a permis de colocaliser PLZF 65 kDa avec la cytokératine 18, une protéine retrouvée en grande quantité dans le cytosquelette puisqu'elle compose les filaments intermédiaires des cellules épithéliales. La même expérience de fractionnement cellulaire a été effectuée avec des cellules épithéliales coloniques de souris, recueillies grâce à une dissociation à l'EDTA. PLZF 65 kDa est localisé au niveau du cytosquelette des cellules épithéliales intestinales de souris, de façon similaire aux cellules cancéreuses en culture. La protéine PLZF 65 kDa aurait alors une fonction distincte de la forme classique de PLZF 81 kDa, étant donné son absence au noyau et la perte de son domaine majeur de répression, soit le motif BTB/POZ.

#### **4. Implication de PLZF 65 kDa dans la prolifération et/ou le maintien de l'état indifférencié des cellules épithéliales intestinales.**

Différents indices portent à croire que PLZF 65 kDa pourrait jouer un rôle dans la prolifération cellulaire et/ou dans le maintien de l'état indifférencié des cellules épithéliales intestinales. L'expression de cette protéine dans les HIEC varie selon la confluence de ces cellules. En effet, une diminution nette à l'atteinte de leur confluence suggère que PLZF 65 kDa pourrait être fonctionnellement associée à la prolifération des cellules intestinales cryptales.

Les cellules Caco-2/15 ont la caractéristique particulière d'entamer un processus de différenciation cellulaire à l'atteinte de la confluence. Il s'agit donc

d'un excellent modèle pour l'étude de la transition entre la prolifération et la différenciation épithéliale ainsi que des mécanismes potentiellement impliqués dans ces processus (Tremblay et al, 2006). Une expérience avec ces cellules a permis de constater une diminution des niveaux d'expression de PLZF 65 kDa au fur et à mesure que les cellules Caco-2/15 augmentent en confluence, et donc, au fur et à mesure que les cellules se différencient. Cette observation suggère que cette nouvelle forme écourtée de PLZF pourrait promouvoir la prolifération des cellules Caco-2/15 à sous-confluence et/ou jouer un rôle dans le maintien de leur état indifférencié.

Lorsque nous intégrons les résultats obtenus avec les cellules HIEC et Caco-2/15, il est tentant de suggérer davantage un rôle pour la forme écourtée de PLZF au niveau de la prolifération des cellules épithéliales intestinales, puisque les cellules HIEC ne se différencient pas en culture à l'atteinte de la confluence.

Les différents résultats obtenus dans notre étude ne sont pas en contradiction avec ceux décrits dans la littérature. Selon les études de Costoya et *al.* et de Buaas et *al.*, PLZF joue un rôle dans le maintien des cellules souches spermatogoniales. Dans ces deux études, la détermination du patron d'expression de PLZF dans les tubules séminifères de testicules normaux a été effectuée par immunofluorescence ou par immunohistochimie, deux techniques ne permettant pas de différencier PLZF 81 kDa de PLZF 65 kDa. De plus, leurs recherches ont été effectuées avec des souris invalidées pour *Plzf*, qui mènent nécessairement à une interférence dans la production des isoformes PLZF 81 kDa et PLZF 65 kDa. Ces études ne permettent donc pas de connaître l'isoforme réellement impliquée dans la

spermatogénèse. Il en est de même pour certaines études impliquant PLZF dans le maintien des cellules progénitrices hématopoïétiques (Reid et al, 1995 ; Chen et al, 1993). Dans plusieurs études de la littérature, seule l'expression génique est vérifiée soit par RT-PCR ou encore par immunobuvardage de type Northern. PLZF 65 et 81 kDa proviennent du même ARNm. Il n'est donc pas possible de conclure laquelle de ces protéines est réellement impliquée dans le processus de l'hématopoïèse. La nature de notre découverte devient une avenue intéressante dans la compréhension du rôle de PLZF dans ces processus.

#### **5. Analyse du rôle potentiel de PLZF 65 kDa dans le cytosquelette des cellules épithéliales intestinales.**

Les protéines associées au cytosquelette peuvent être impliquées dans différents processus cellulaires tels que par exemple l'adhésion, la polymérisation de l'actine, la stabilisation et l'alignement des microtubules et la contractilité cellulaire. Plusieurs de ces processus sont eux-mêmes directement associés à la division cellulaire et la cytokinèse. Étant donné la plus forte expression de PLZF 65 kDa dans les cellules prolifératives et sa localisation au niveau du cytosquelette, il est possible que cette forme écourtée puisse jouer un rôle important dans certaines étapes de la division cellulaire, comme le font plusieurs protéines associées au cytosquelette telles que les kinases Aurora. Ces dernières sont des protéines cruciales pour le contrôle de la mitose durant le cycle cellulaire puisqu'elles sont impliquées entre autres dans la séparation des chromatides et dans la cytokinèse (Fu et al, 2007). Comme plusieurs autres protéines associées au cytosquelette, les protéines Aurora sont des kinases dont la phosphorylation est

associée entre autres à l'assemblage des microtubules durant la mitose. Dans le cas de PLZF, une analyse informatique avec l'aide du site internet <http://www.ebi.ac.uk/InterProScan> a permis de constater que cette protéine ne possédait pas de domaine kinasique classique. Que pourrait donc être le mécanisme d'action de PLZF 65 kDa au niveau du cytosquelette des cellules épithéliales intestinales, et quelle pourrait être son implication précise dans la prolifération cellulaire ?

Le cytosquelette est formé d'un réseau de filaments interconnectés appelés microfilaments d'actine, microtubules et filaments intermédiaires (Lodish et al, 1997 ; Barak et al, 2004). La cytokératine 18 est un composant majeur des filaments intermédiaires retrouvés dans les cellules des épithéliums simples (Ueno et al, 2005). La colocalisation de PLZF 65 kDa et de la cytokératine 18 dans les cellules cancéreuses colorectales suggère la présence et l'implication possible de cette forme écourtée dans des processus cellulaires impliquant les filaments intermédiaires. Le rôle des filaments intermédiaires dans la cellule n'est pas complètement élucidé, mais leur association à la membrane indique qu'ils auraient surtout un rôle structural. Les kératines sont entre autres liées aux desmosomes et aux hémidesmosomes, ce qui leur permet de participer aux interactions cellule-cellule et cellule-matrice. Peu de protéines associées aux filaments intermédiaires sont connues jusqu'à ce jour, et aucune de ces protéines n'est connue pour son implication dans le démembrement des filaments intermédiaires au cours de la mitose. PLZF 65 kDa étant davantage exprimé lorsque les cellules sont prolifératives, il est possible qu'il soit impliqué dans ce processus de dépolymérisation des filaments intermédiaires lors de la division cellulaire.



Plusieurs études ont soulevé un rôle pour la kinase Cdk1 dans le désassemblage des filaments intermédiaires. La phosphorylation entre autres de la vimentine, un composant des filaments intermédiaires des fibroblastes, de la desmine, un composant des filaments intermédiaires des cellules musculaires et des lamines par Cdk1 entraînerait leur dispersion avant la mitose. Il y aurait alors par la suite réassemblage après que la cytokinèse soit complétée (Lodish et al, 1997 ; Peter et al, 1990 ; Izawa et Inagaki, 2006). Il a également été démontré que PLZF pouvait être phosphorylé par Cdk1, dans un motif situé dans une région conservée de PLZF 65 kDa. En effet, la phosphorylation de PLZF ne nécessite pas le domaine BTB-POZ (Ball et al, 1999). PLZF 65 kDa pourrait donc être, tout comme les filaments intermédiaires, phosphorylé en phase M par Cdk1, et être ainsi impliqué directement ou indirectement dans le désassemblage de ces filaments lors de la mitose.

L'association directe de PLZF 65 kDa avec les filaments intermédiaires n'a toujours pas été confirmée. Il est donc possible que cette nouvelle forme de PLZF joue plutôt un rôle de protéine associée à un autre type de filaments du cytosquelette tels que les microtubules ou les microfilaments d'actine. L'étude d'interaction potentielle entre PLZF 65 kDa et certaines molécules du cytosquelette devra être étudiée de façon plus approfondie.

## V- Conclusions et perspectives

La présente étude a permis l'identification d'une nouvelle forme de la protéine PLZF. Il s'agit d'une protéine de 65 kDa qui origine probablement de la traduction à partir d'un second site d'initiation en aval de l'ATG classique. L'expression de cette forme écourtée est modulée en fonction de l'état prolifératif des cellules cancéreuses colorectales Caco-2/15 et des cellules cryptales d'iléon fœtal humain HIEC. En effet, son expression diminue à l'atteinte de la confluence à un moment où les cellules ralentissent ou cessent leur prolifération par inhibition de contact. De plus, étant donné que les cellules Caco-2/15 ont la propriété d'entamer un processus de différenciation à l'atteinte de la confluence, il est possible de croire que cette diminution d'expression puisse être due à une perte de l'état indifférencié. PLZF 65 kDa pourrait donc possiblement jouer un rôle dans la prolifération et/ou le maintien de l'état indifférencié des cellules épithéliales intestinales. L'hypothèse reliant PLZF 65 kDa à la prolifération cellulaire est plus probable étant donné que les cellules HIEC ne se différencient pas en culture. PLZF 65 kDa est localisé au niveau du cytosquelette des cellules cancéreuses colorectales humaines et des cellules épithéliales coloniques de souris, et son rôle exact dans ce compartiment demeure inconnu.

Plusieurs aspects de ce projet de recherche demeurent inexplorés. Des shRNAs, efficaces pour la diminution de l'expression de PLZF 81 kDa (non montré), pourront être utilisés pour appuyer davantage le fait que PLZF 65 kDa provient du même ARNm que la forme complète de PLZF. Plusieurs lignées cancéreuses colorectales humaines n'expriment que l'isoforme de 65 kDa. L'efficacité des

différents shRNAs dans ces cellules pourra alors être prochainement vérifiée et, s'ils se montrent efficaces, permettront de conclure hors de tout doute que PLZF 65 kDa est bel et bien un produit du gène Zbtb16 (PLZF).

Ces mêmes shRNAs pourront être utilisés pour déterminer le rôle précis de PLZF 65 kDa dans les lignées cancéreuses colorectales. Puisqu'elles n'expriment pas la forme de 81 kDa, ces cellules seront idéales pour vérifier l'effet d'une diminution de PLZF 65 kDa sur la prolifération cellulaire de même que sur d'autres processus tels que l'apoptose et la différenciation. Le rôle plus précis de cette protéine dans le cytosquelette sera également à étudier de façon plus approfondie. La localisation de PLZF dans les unités fonctionnelles intestinales et coloniques devra également être déterminée. Pour ce faire, des expériences d'immunofluorescences pourront être effectuées sur des coupes d'intestin de provenance murine et humaine.

La surexpression des protéines PLZF 81 et 65 kDa dans différentes lignées cellulaires permettra également l'étude approfondie de la fonction de ces deux protéines. L'utilisation d'un vecteur inductible sera un outil de choix pour cette partie de l'étude puisque certaines observations préliminaires ont suggéré un effet néfaste de PLZF 65 kDa lorsque surexprimé dans les cellules.

La localisation de PLZF 65 kDa au niveau du cytosquelette des cellules épithéliales intestinales apporte de nouvelles perspectives à cette étude. La caractérisation des interactions potentielles entre PLZF 65 kDa et différentes molécules du cytosquelette devra être effectuée. Le rôle précis de cette protéine

dans ce compartiment cellulaire et son implication dans la prolifération cellulaire via ses différentes interactions sera à déterminer.

Étant donné sa forte détection dans les lignées cancéreuses colorectales humaines, PLZF 65 kDa pourrait potentiellement être impliqué dans la tumorigénèse colonique. Une souris transgénique surexprimant l'isoforme PLZF 65 kDa au niveau de son épithélium intestinal et colonique permettra de vérifier si la présence plus forte de cette protéine mène à une augmentation de l'incidence de tumeurs.

Finalement, l'étude de la morphologie intestinale des souris luxoïdes invalidées pour le gène *Plzf* permettra de déterminer si l'absence de PLZF affecte l'homéostasie de l'épithélium de cet organe. Cette étude permettra de vérifier si PLZF joue bien un rôle dans le maintien de la population souche de l'épithélium intestinal, comme c'est le cas pour les testicules et les cellules hématopoïétiques.

## REMERCIEMENTS

Plusieurs personnes ont grandement contribué à la réussite de ce projet. Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr François Boudreau, qui, en m'accueillant au sein de son laboratoire, m'a permis de connaître et d'apprécier le monde merveilleux de la biologie cellulaire, ce qui m'a grandement aidé dans mon choix de carrière. La motivation n'étant pas toujours au rendez-vous, François était toujours là pour voir le positif dans chacun de mes résultats. Sa bonne humeur est contagieuse, ce qui a rendu l'atmosphère de travail vraiment agréable ! Je ne crois pas pouvoir imaginer mieux comme patron !

Je tiens également à remercier Isabelle, Geneviève D., Geneviève B., Carine, Jean-Philippe, Mathieu et Sébastien, les collègues (et amis !) du laboratoire, sans qui ces années n'auraient pas été aussi enrichissantes et amusantes !

Je remercie aussi tous les membres du département, professeurs, étudiants et secrétaires, qui ont tous contribué à leur façon à ma formation scientifique. Un merci particulier à Fabien Nadeau, sans qui la décontamination et le nettoyage de la verrerie seraient de lourdes tâches pour nous !

Je tiens à remercier mes parents, William et Michelle, qui m'ont hébergé et supporté pendant mes longues années d'études. Je veux également remercier David Gagné, qui m'a écouté et encouragé pendant les moments les plus difficiles, et Sophie Sivret, une amie qui rend toute épreuve plus facile à surmonter ! Je vous aime tous beaucoup !

Je voudrais finalement remercier spécialement les Dr Jean-François Beaulieu et Dre Claire Dubois, qui ont eu la gentillesse de bien vouloir réviser ce mémoire.

Gros merci à tous !

## RÉFÉRENCES

- Ahmad, K. F., Engel, C. K. & Prive, G. G. Crystal structure of the BTB domain from PLZF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 12123-12128 (1998).
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. Biologie moléculaire de la cellule. *Flammarion*, 4<sup>e</sup> Édition, 211-216, 923-927 (2004).
- Avantaggiato, V., Pandolfi, P. P., Ruthardt, M., Hawe, N., Acampora, D., Giuseppe Pelicci, P. & Simeone, A. Developmental analysis of murine Promyelocyte Leukemia Zinc Finger (PLZF) gene expression: implications for the neuromeric model of the forebrain organization. *J. Neurosci.* **15**, 4927-4942 (1995).
- Baird, S. D., Turcotte, M., Korneluk, R. G. & Holcik, M. Searching for IRES. *RNA* **12**, 1755-1785 (2006).
- Ball, H. J., Melnick, A., Shaknovich, R., Kohanski, R. A. & Licht, J. D. The promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) protein binds DNA in a high molecular weight complex associated with cdc2 kinase. *Nucleic Acids Res.* **27**, 4106-4113 (1999).
- Barak, V., Goike, H., Panaretakis, K. W. & Einarsson, R. Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. *Clin. Biochem.* **37**, 529-540 (2004).
- Barna, M., Hawe, N., Niswander, L. & Pandolfi, P. P. Plzf regulates limb and axial skeletal patterning. *Nat. Genet.* **25**, 166-172 (2000).
- Barna, M., Merghoub, T., Costoya, J. A., Ruggero, D., Branford, M., Bergia, A., Samori, B. & Pandolfi, P. P. Plzf mediates transcriptional repression of HoxD gene expression through chromatin remodeling. *Dev. Cell.* **3**, 499-510 (2002).
- Barna, M., Pandolfi, P. P. & Niswander, L. Gli3 and Plzf cooperate in proximal limb patterning at early stages of limb development. *Nature* **436**, 277-281 (2005).
- Beaulieu, J. F. & Quaroni, A. Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells. *Biochem. J.* **280** ( Pt 3), 599-608 (1991).
- Booth, C. & Potten, C. S. Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *J. Clin. Invest.* **105**, 1493-1499 (2000).
- Buaas, F. W., Kirsh, A. L., Sharma, M., McLean, D. J., Morris, J. L., Griswold, M. D., de Rooij, D. G. & Braun, R. E. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat. Genet.* **36**, 647-652 (2004).
- Chauchereau, A., Mathieu, M., de Saintignon, J., Ferreira, R., Pritchard, L. L., Mishal, Z., Dejean, A. & Harel-Bellan, A. HDAC4 mediates transcriptional repression by the acute promyelocytic leukaemia-associated protein PLZF. *Oncogene* **23**, 8777-8784 (2004).

- Chen, Z., Brand, N. J., Chen, A., Chen, S. J., Tong, J. H., Wang, Z. Y., Waxman, S. & Zelent, A. Fusion between a novel Kruppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor-alpha locus due to a variant t(11;17) translocation associated with acute promyelocytic leukaemia. *EMBO J.* **12**, 1161-1167 (1993).
- Cook, M., Gould, A., Brand, N., Davies, J., Strutt, P., Shakhovich, R., Licht, J., Waxman, S., Chen, Z., Gluecksohn-Waelsch, S., Krumlauf, R. & Zelent, A. Expression of the zinc-finger gene PLZF at rhombomere boundaries in the vertebrate hindbrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 2249-2253 (1995).
- Costoya, J. A., Hobbs, R. M., Barna, M., Cattoretti, G., Manova, K., Sukhwani, M., Orwig, K. E., Wolgemuth, D. J. & Pandolfi, P. P. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat. Genet.* **36**, 653-659 (2004).
- Costoya, J. A. & Pandolfi, P. P. The role of promyelocytic leukemia zinc finger and promyelocytic leukemia in leukemogenesis and development. *Curr. Opin. Hematol.* **8**, 212-217 (2001).
- David, G., Alland, L., Hong, S. H., Wong, C. W., DePinho, R. A. & Dejean A. Histone deacetylase associated with mSin3A mediates repression by the acute promyelocytic leukemia-associated PLZF protein. *Oncogene* **16**, 2549-2556 (1998).
- Dhordain, P. & Albagli, O. SMRT est un co-répresseur commun aux récepteurs nucléaires et aux protéines oncogéniques à domaine POZ, LAZ3 et PLZF. *Médecine/sciences.* **14**, 219-222 (1998).
- Dong, S., Zhu, J., Reid, A., Strutt, P., Guidez, F., Zhong, H. J., Wang, Z. Y., Licht, J., Waxman, S., Chomienne, C., Chen, Z., Zelent, A. & Chen, S. J. Amino-terminal protein-protein interaction motif (POZ-domain) is responsible for activities of the promyelocytic leukemia zinc finger-retinoic acid receptor-alpha fusion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 3624-3629 (1996).
- Felicetti, F., Bottero, L., Felli, N., Mattia, G., Labbaye, C., Alvino, E., Peschle, C., Colombo, M. P. & Carè, A. Role of PLZF in melanoma progression. *Oncogene* **23**, 4567-4576 (2004).
- Fréchette, I. Rôle du facteur de transcription CDP dans l'épithélium intestinal colanique et dans la prolifération cellulaire. *Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke* (2006).
- Fogh, J., Fogh, J. M. & Orfeo, T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer. Inst.* **59**, 221-226 (1977).
- Fu, J., Bian, M., Jiang, Q. & Zhang, C. Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Mol. Cancer. Res.* **5**, 1-10 (2007).
- Geibel, J. P. Secretion and absorption by colonic crypts. *Annu. Rev. Physiol.* **67**, 471-490 (2005).



- Guidez, F. Howell, L., Isalan, M., Cebrat, M., Alani, R. M., Ivins, S., Hormaeche, I., McConnell, M. J., Pierce, S., Cole, P. A., Licht, J. & Zelent, A. Histone acetyltransferase activity of p300 is required for transcriptional repression by the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 5552-5566 (2005).
- Hauri, H. P., Sterchi, E. E., Bienz, D., Fransen, J. A. & Marxer, A. Expression and intracellular transport of microvillus membrane hydrolases in human intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.* **101**, 838-851 (1985).
- Hong, S. H., David, G., Wong, C. W., Dejean, A. & Privalsky, M. L. SMRT corepressor interacts with PLZF and with the PML-retinoic acid receptor alpha (RARalpha) and PLZF-RARalpha oncoproteins associated with acute promyelocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 9028-9033 (1997).
- Ikeda, R., Yoshida, K., Tsukahara, S., Sakamoto, Y., Tanaka, H., Furukawa, K. I. & Inoue, I. The promyelotic leukemia zinc finger promotes osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells as an upstream regulator of CBFA1. *J. Biol. Chem.* **280**, 8523-8530 (2005).
- Ivins, S., Pemberton, K., Guidez, F., Howell, L., Krumlauf, R. & Zelent A. Regulation of Hoxb2 by APL-associated PLZF protein. *Oncogene* **22**, 3685-3697 (2003).
- Izawa, I. & Inagaki, M. Regulatory mechanisms and functions of intermediate filaments: A study using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *Cancer Sci.* **97**, 167-174 (2006).
- Jackson, R. J. Alternative mechanisms of initiating translation of mammalian mRNAs. *Biochem. Soc. Trans.* **33 (Pt6)**, 1231-1241 (2005).
- Kang, S. I., Chang, W. J., Cho, S. G. & Kim, I. Y. Modification of promyelocytic leukemia zinc finger protein (PLZF) by SUMO-1 conjugation regulates its transcriptional repressor activity. *J. Biol. Chem.* **278**, 51479-51483 (2003).
- Karam, S. M. Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Front. Biosci.* **4**, D286-98 (1999).
- Kelly, K. F. & Daniel, J. M. POZ for effect--POZ-ZF transcription factors in cancer and development. *Trends Cell Biol.* **16**, 578-587 (2006).
- Ko, J. H., Son, W., Bae, G. Y., Kang, J. H., Oh, W. & Yoo, O. J. A new hepatocytic isoform of PLZF lacking the BTB domain interacts with ATP7B, the Wilson disease protein, and positively regulates ERK signal transduction. *J. Cell. Biochem.* **99**, 719-734 (2006).
- Koken, M. H., Reid, A., Quignon, F., Chelbi-Alix, M. K., Davies, J. M., Kabarowski, J. H. S., Zhu, J., Dong, S., Chen, S. J., Chen, Z., Tan, C. C., Licht, J., Waxman S., De Thé, H. & Zelent A. Leukemia-associated retinoic acid receptor alpha fusion partners, PML and PLZF, heterodimerize and colocalize to nuclear bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 10255-10260 (1997).
- Komar, A. A. & Hatzoglou, M. Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: Mystery of their existence. *J. Biol. Chem.* **280**, 23425-23428 (2005).

- Kotaja, N. & Sassone-Corsi, P. Plzf pushes stem cells. *Nat. Genet.* **36**, 551-553 (2004).
- Kozak, M. Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res.* **12**, 857-872 (1984).
- Kozak, M. The scanning model for translation: an update. *J. Cell Biol.* **108**, 229-241 (1989).
- Labbaye, C., Quaranta, M. T., Pagliuca, A., Militi, S., Licht, J., Testa, U. & Peschle, C. PLZF induces megakaryocytic development, activates Tpo receptor expression and interacts with GATA1 protein. *Oncogene* **21**, 6669-6679 (2002).
- Li, J. Y., English, M. A., Ball, H. J., Yeyati, P. L., Waxman, S. & Licht, J. D. Sequence-specific DNA binding and transcriptional regulation by the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *J. Biol. Chem.* **272**, 22447-22455 (1997).
- Lodish, Baltimore, Berk, Zipursky, Matsudaira & Darnell. Biologie moléculaire de la cellule. *DeBoeck Université*, 3<sup>e</sup> Édition, 1106-1123 (1997).
- Marshman, E., Booth, C. & Potten, C. S. The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays* **24**, 91-98 (2002).
- McConnell, M. J., Chevallier, N., Berkofsky-Fessler, W., Giltane, J. M., Malani, R. B., Staudt, L. M. & Licht, J. D. Growth suppression by acute promyelocytic leukemia-associated protein PLZF is mediated by repression of c-myc expression. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 9375-9388 (2003).
- McDonald, S. A., Preston, S. L., Lovell, M. J., Wright, N. A. & Jankowski, J. A. Mechanisms of disease: from stem cells to colorectal cancer. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* **3**, 267-274 (2006).
- Melnick, A., Ahmad, K. F., Arai, S., Polinger, A., Ball, H., Borden, K. L., Carlile, G. W., Prive, G. G. & Licht, J. D. In-depth mutational analysis of the promyelocytic leukemia zinc finger BTB/POZ domain reveals motifs and residues required for biological and transcriptional functions. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 6550-6567 (2000).
- Melnick, A., Carlile, G., Ahmad, K. F., Kiang, C. L., Corcoran, C., Bardwell, V., Prive, G. G. & Licht, J. D. Critical residues within the BTB domain of PLZF and Bcl-6 modulate interaction with corepressors. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 1804-1818 (2002).
- Melnick, A. M., Westendorf, J. J., Polinger, A., Carlile, G. W., Arai, S., Ball, H. J., Lutterbach, B., Hiebert, S. W. & Licht, J. D. The ETO protein disrupted in t(8;21)-associated acute myeloid leukemia is a corepressor for the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 2075-2086 (2000b).
- Ménard, D. & Pothier, P. Differential distribution of digestive enzymes in isolated epithelial cells from developing human fetal small intestine and colon. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **6**, 509-516 (1987).
- Moore, K. A. & Lemischka, I. R. Stem cells and their niches. *Science* **311**, 1880-1885 (2006).

- Nanba, D., Mammoto, A., Hashimoto, K. & Higashiyama, S. Proteolytic release of the carboxy-terminal fragment of proHB-EGF causes nuclear export of PLZF. *J. Cell Biol.* **163**, 489-502 (2003).
- Okamoto, R. & Watanabe M. Molecular and clinical basis for the regeneration of human gastrointestinal epithelia. *J. Gastroenterol.* **39**, 1-6 (2004).
- Pageot, L. P., Pearreault, N., Basora, N., Francoeur, C., Magny, P. & Beaulieu, J. F. Human cell models to study small intestinal functions: recapitulation of the crypt-villus axis. *Microsc. Res. Tech.* **49**, 394-406 (2000).
- Parrado, A., Noguera, M. E., Delmer, A., McKenna, S., Davies, J., Le Gall, I., Bentley, P., Whittaker, J. A., Sigaux, F., Chomienne, C. & Padua, R. A. Deregulated expression of promyelocytic leukemia zinc finger protein in B-cell chronic lymphocytic leukemias does not affect cyclin A expression. *Hematol. J.* **1**, 15-27 (2000).
- Parrado, A., Robledo, M., Moya-Quiles, M. R., Marin, L. A., Chomienne, C., Padua, R. A. & Alvarez-Lopez, M. R. The promyelocytic leukemia zinc finger protein down-regulates apoptosis and expression of the proapoptotic BID protein in lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 1898-1903 (2004).
- Perreault, N. & Beaulieu, J.F. Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. *Exp. Cell Res.* **224**, 354-364 (1996).
- Peter, M., Nakagawa, J., Doree, M., Labbe, J. C. & Nigg, E. A. In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell.* **61**, 591-602 (1990).
- Pinto, D. & Clevers, H. Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium. *Exp. Cell Res.* **306**, 357-363 (2005).
- Pinto, M., Robine-Leon, S., Appay, M. D., Keding, M., Triadou, N., Dussaulx, E., Simon-Assmann, P., Haffen, K., Fogh, J. & Zweibaum, A. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell.* **47**, 323-330 (1983).
- Potten, C. S. Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **353**, 821-830 (1998).
- Potten, C. S. & Loeffler, M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* **110**, 1001-1020 (1990).
- Puccetti, E., Zheng, X., Brambilla, D., Seshire, A., Beissert, T., Boehrer, S., Nürnberg, H., Hoelzer, D., Gerhard Ottmann, O., Nervi, C. & Ruthardt, M. The integrity of the charged pocket in the BTB/POZ domain is essential for the phenotype induced by the leukemia-associated t(11;17) fusion protein PLZF/RARalpha. *Cancer Res.* **65**, 6080-6088 (2005).
- Radtke, F. & Clevers, H. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science* **307**, 1904-1909 (2005).

Reid, A., Gould, A., Brand, N., Cook, M., Strutt, P., Licht, J., Waxman, S., Krumlauf, R. & Zelent, A. Leukemia translocation gene, PLZF, is expressed with a speckled nuclear pattern in early hematopoietic progenitors. *Blood* **86**, 4544-4552 (1995).

Sancho, E., Batlle, E. & Clevers, H. Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 695-723 (2004).

Shaknovich, R., Yeyati, P. L., Ivins, S., Melnick, A., Lempert, C., Waxman, S., Zelent, A. & Licht, J. D. The promyelocytic leukemia zinc finger protein affects myeloid cell growth, differentiation, and apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 5533-5545 (1998).

Shiraishi, K., Yamasaki, K., Nanba, D., Inoue, H., Hanakawa, Y., Shirakata, Y., Hashimoto, K. & Higashiyama, S. Pre-B-cell leukemia transcription factor 1 is a major target of promyelocytic leukemia zinc-finger-mediated melanoma cell growth suppression. *Oncogene* **26**, 339-348 (2007).

Spradling, A., Drummond-Barbosa, D. & Kai, T. Stem cells find their niche. *Nature* **414**, 98-104 (2001).

Spriggs, K. A., Bushell, M., Mitchell, S. A. & Willis, A. E. Internal ribosome entry segment-mediated translation during apoptosis: the role of IRES-trans-acting factors. *Cell Death Differ.* **12**, 585-591 (2005).

Trainer, D. L., Kline, T., McCabe, F. L., Faucette, L. F., Feild, J., Chaikin, M., Anzano, M., Rieman, D., Hoffstein, S., Li, D. J., Gennaro, D., Buscarino, C., Lynch, M., Poste, G. & Greig, R. Biological characterization and oncogene expression in human colorectal carcinoma cell lines. *Int. J. Cancer.* **41**, 287-296 (1988).

Tremblay, E., Auclair, J., Delvin, E., Levy, E., Ménard, D., Pshezhetsky, A. V., Rivard, N., Seidman, E. G., Sinnett, D., Vachon, P. H. & Beaulieu, J. F. Gene expression profiles of normal proliferating and differentiating human intestinal epithelial cells: a comparison with the Caco-2 cell model. *J. Cell. Biochem.* **99**, 1175-1186 (2006).

Ueno, T., Toi, M. & Linder, S. Detection of epithelial cell death in the body by cytokeratin 18 measurement. *Biomed. Pharmacother.* **59**, S359-S362 (2005).

Ward, J. O., McConnell, M. J., Carlile, G. W., Pandolfi, P. P., Licht, J. D. & Freedman, L. P. The acute promyelocytic leukemia-associated protein, promyelocytic leukemia zinc finger, regulates 1,25-dihydroxyvitamin D(3)-induced monocytic differentiation of U937 cells through a physical interaction with vitamin D(3) receptor. *Blood* **98**, 3290-3300 (2001).

Wheater, Young & Heath. Histologie fonctionnelle. DeBoeck Université. **4<sup>e</sup> Édition**, 249-273 (2001).

Wong, C. W. & Privalsky, M. L. Components of the SMRT corepressor complex exhibit distinctive interactions with the POZ domain oncoproteins PLZF, PLZF-RARalpha, and BCL-6. *J. Biol. Chem.* **273**, 27695-27702 (1998).

Yeyati, P. L., Shaknovich, R., Boterashvili, S., Li, J., Ball, H. J., Waxman, S., Nason-Burchenal, K., Dmitrovsky, E., Zelent, A. & Licht, J. D. Leukemia translocation protein PLZF inhibits cell growth and expression of cyclin A. *Oncogene* **18**, 925-934 (1999).

Zhang, T., Xiong, H., Kan, L. X., Zhang, C. K., Jiao, X. F., Fu, G., Zhang, Q. H., Lu, L., Tong, J. H., Gu, B. W. Yu, M., Liu, J. X., Licht, J., Waxman S., Zelent, A., Chen, E. & Chen, S. J. Genomic sequence, structural organization, molecular evolution, and aberrant rearrangement of promyelocytic leukemia zinc finger gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 11422-11427 (1999).